



Régulation de l'adressage et de la fonction du transporteur d'ammonium RhBG par phosphorylation et liaison à l'ankyrine G.

Sohet Fabien

► To cite this version:

Sohet Fabien. Régulation de l'adressage et de la fonction du transporteur d'ammonium RhBG par phosphorylation et liaison à l'ankyrine G.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : . tel-00458374

HAL Id: tel-00458374

<https://theses.hal.science/tel-00458374>

Submitted on 21 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. Sciences du Vivant
Bâtiment Lamarck
35, rue Hélène Brion
75205 PARIS CEDEX 13

Unité INSERM U665
Institut National de la Transfusion Sanguine
6, rue Alexandre Cabanel
75739 PARIS CEDEX 15

Thèse de Doctorat de l'Université Paris Diderot - Paris 7

Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire

Spécialité Génome et Protéines

Présentée par

Fabien SOHET

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris Diderot – Paris 7

Régulation de l'adressage et de la fonction du transporteur d'ammonium RhBG par phosphorylation et liaison à l'ankyrine G

Soutenue le 30 septembre 2008

devant le jury composé de

Pr Patrick VICART, Université Paris Diderot
Dr Franck BORGESE, CNRS
Dr Bruno CONSTANTIN, CNRS
Dr Dominique ELADARI, CNRS
Dr Claude LOPEZ, INTS
Pr Caroline LE VAN KIM, Université Paris Diderot

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

À Ambre et Fabien (le grand, pas moi)

Enfin ! Les manips sont bouclées, l'article est accepté, la rédaction du mémoire est achevée, le matelas gonflable spécial labo est rangé, la poussière sur mon bureau va arriver. C'en est fini. Bientôt on va pouvoir m'appeler Docteur et rigoler en me disant que je n'en suis pas un vrai ! Mais qu'importe, le bonheur d'être passé par ces trois années formatrices se fait ressentir. La pression ne va plus tarder à être relâchée. En attendant, de nombreuses personnes sont impliquées dans cette expérience.

Je tiens à remercier le Docteur Yves COLIN pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM UMR-S 665 et pour m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse dans une ambiance détendue.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Je remercie particulièrement le Professeur Patrick VICART pour avoir accepté de présider le jury et pour l'enseignement qu'il m'a prodigué.

Je remercie sincèrement les Docteurs Franck BORGESE et Bruno CONSTANTIN pour avoir accepté la tâche exigeante de rapporteur.

Merci au Docteur Dominique ELADARI pour avoir accepté d'examiner cette thèse et pour m'avoir proposé un stage post-doctoral.

Un grand merci au Docteur Claude LOPEZ, alias mon Glaude, pour m'avoir formé et guidé depuis mon arrivée au laboratoire. Merci Glaude pour ta patience, tes encouragements et ta présence. Je crois que la « RhBG Rugby Crew » restera longtemps gravée dans ma mémoire.

Merci au Docteur Jean-Pierre CARTRON de m'avoir fait profiter de ses connaissances sur la biologie des groupes sanguins.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Caroline LE VAN KIM pour m'avoir encadré et conseillé tout au long de ma thèse. Tes qualités scientifiques ont été essentielles à la réalisation de ce travail et tes critiques, constructives bien sûr, m'ont énormément apporté.

Merci au Dr Pierre RIPOCHE pour m'avoir formé au Stopped-Flow et pour son aide précieuse.

Merci à tous avec, par ordre alphabétique :

- Dr Pablo BARTOLUCCI, alias le vrai Doc, pour tes anecdotes infinies, tiens ça me rappelle d'ailleurs... Merci également pour m'avoir fait découvrir Rodrigo Y Gabriela.

- Dr Olivier BERTRAND, sans qui rien ne se serait passé.

- Dr Vicky CHAAR, j'ai oublié un « A » non ? Merci pour ton soutien, ta gentillesse et pour m'avoir fait goûter le Punch Coco.

- Sylvie COCHET, alias « Manman », pour nos Bo Buns du midi et nos discussions dans le métro qui t'ont fait manquer ta station.

- Emmanuel COLLEC, alias Manu ou Joe Dalton, pour nos crises de fou rire et nos chansons endiablées. Merci mon Man, sans toi ce n'aurait pas été pareil.

- Dr Wassim EL NEMER, alias TCHAIU ou bien PACAU, pour tes précieux conseils scientifiques, pour ta terrasse et enfin, pour m'avoir fait louper la manip du siècle.

- Dr Anne FILIPPE, pour m'avoir écouté me plaindre et m'avoir conseillé.

- Dr Emilie GAUTHIER, pour m'avoir fait découvrir les joies de la thèse en avance.

- Anna GUADALL, pour avoir apporté un rayon de soleil chaque jour de ta présence au labo, pour tes « saucisses Xup Xup » (prononcez Choup Choup) et pour ta gentillesse.

- Sandrine GENETET, pour m'avoir grandement aidé dans les manips, et je suis désolé que tu aies dû subir mes chansons dans le grand labo.

- Sylvain METRAL, alias Mister Tralmé ou Averell Dalton, pour m'avoir supporté dans le bureau, aidé les premiers jours de mon arrivée et écouté me plaindre.

- Dr Gael NICOLAS, alias G ou William Dalton, pour nos discussions scientifiques mais également musicales. Bonne continuation à toi, Daft Boy.

- Julien PICOT, alias FACSman, pour tes analyses et pour le coup de fil à midi pile.

- Dr Cécile RAHUEL, pour tes précieux conseils et ta gentillesse.

- Wina SEDECIAS, alias WINE, pour ton écoute attentive, pour être aussi naturelle, pour m'avoir fait énormément rigoler et pour m'avoir volé mon polo...

- Camilo VILELA LAMEGO, pour ne pas m'avoir laissé seul au bar...

Je tiens à m'excuser auprès des membres du « bureau des étudiants » car je sais que j'ai dû vous fatiguer certains jours.

Merci à tous les membres de l'Unité INSERM U665 que je n'ai pas nommés mais dont j'ai croisé la route, ainsi que tous les étudiants qui ont effectué leur stage dans le laboratoire.

Je remercie également le Dr Véronique JOLIOT et l'ensemble des collègues de l'Université Paris-Diderot, le monitorat a été une expérience très enrichissante.

Je veux, bien évidemment, remercier mes parents qui m'ont aidé et supporté pendant ces longues années d'apprentissage, moi qui devais m'arrêter après le BTS !

Merci Claire et Olivier pour m'avoir laissé dormir chez vous lorsque je passais ma vie au labo et pour m'avoir si bien accueilli.

Merci Xavier et Aline pour m'avoir fait oncle et parrain lors de cette fin de thèse. Je dédicace ce mémoire de thèse à Ambre mais également au grand Fabien à qui je pense très souvent.

Et le meilleur pour la fin, merci Sou-Vinh pour tes encouragements, ta patience et ton aide morale. Je sais que sans toi, j'aurais eu du mal à rester motivé. Ne t'inquiète pas, plus qu'un, voire deux, post-docs, quelques passages devant un jury pour être Chercheur ou Maître de Conférences et nous aurons une vie plus stable.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	6
ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	11
1 – La famille Rh	12
1.1 – Les protéines Rh érythrocytaires.....	12
<u>1.1.1 – Généralités sur les groupes sanguins.....</u>	12
<u>1.1.2 – Génétique du système RH.....</u>	14
1.1.2.1 - Les gènes RH	14
1.1.2.2 - Les protéines RhD et RhCE.....	16
1.1.2.3 - Les polymorphismes.....	17
1.1.2.4 - Les variants.....	19
<u>1.1.3 – Le complexe Rh.....</u>	19
1.1.3.1 – Les protéines du complexe.....	20
1.1.3.2 – Association au squelette membranaire du GR.....	22
1.1.3.3 – Les ankyrines	24
1.1.3.4 – Interaction entre Rh/RhAG et le squelette membranaire via l'ankyrine R.....	26
<u>1.1.4 - Les orthologues.....</u>	27
1.2 – Les homologues non érythroïdes des protéines Rh.....	27
<u>1.2.1 – RhBG.....</u>	28
<u>1.2.2 – RhCG.....</u>	30
<u>1.2.3 – Localisation cellulaire de RhBG et RhCG.....</u>	31
2 - Les transporteurs d'ammonium.....	32
2.1 - La famille Mep	33
2.1.1 - Du gène <i>mep</i> à la protéine Mep	33
2.1.2 - Mep et la signalisation	34
2.1.3 - Régulations de Mep	35
2.2 - La famille Amt	36
2.2.1 - Du gène <i>amt</i> à la protéine Amt	36
2.2.2 - Régulation du métabolisme azoté.....	36
2.2.3 - Régulation de l'AmtB.....	38
2.2.4 - Etudes du mécanisme du transport d'ammonium chez les Amts.....	40
2.2.5 - Structure de l'AmtB	41
2.3 – Les protéines de la famille Rh, transporteurs d'ammonium ?	42
2.3.1 - Localisation cellulaire de RhBG et RhCG.....	42
2.3.1.1 - Le cerveau	43
2.3.1.2 - Le tractus intestinal et le foie.....	44
2.3.1.3 - Le rein.....	44
2.3.2 - Transport d'ammonium le long du néphron	45
2.3.3 - Etudes fonctionnelles des glycoprotéines Rh.....	49
2.3.4 - Etude de la structure tridimensionnelle des glycoprotéines Rh	56
2.3.5 - Rôle fonctionnel de Rhbg	58
3 – Régulation de l'expression membranaire de RhBG	61
OBJECTIFS.....	65
MATERIELS ET METHODES	68
1 - Matériels	69
1.1 - Oligonucléotides	69
1.2 - Vecteurs plasmidiques	69
1.3 - Anticorps	70

1.3.1 – Anticorps	70
1.3.2 – Production d'un anticorps murin anti-RhBG	70
1.3.3 – Production d'un anticorps anti-phosphopeptide de lapin	71
2 – Biologie Moléculaire	72
2.1 - Clonage moléculaire	72
2.2 - Séquençage	72
2.3 - Mutagenèse dirigée	73
2.4 - Production de protéine de fusion GST-Cter	73
2.4.1 – Souches de bactéries <i>E. coli</i> BL21 et TKB1	73
2.4.2 – Conditions de culture des bactéries BL21	73
2.4.3 – Conditions de culture des bactéries TKB1	74
2.4.4 – Purification des protéines de fusion GST	74
3 – Biologie cellulaire	75
3.1 - Lignées et culture cellulaires	75
3.2 - Transfections	75
3.3 - Cytométrie en flux	76
3.4 - Clonage cellulaire	77
3.5 – Immunofluorescence et microscopie confocale	77
4 - Spectrofluorimétrie en flux interrompu : Stopped-Flow	78
4.1 - Matériels pour l'analyse du transport facilité de NH_3	78
4.2 – Préparation des cellules	78
4.3 - Mesures du transport	79
5 - Biochimie	81
5.1 - Electrophorèse et transfert de protéines sur membrane	81
5.2 - Révélation immunologique et autoradiographique	81
5.3 - Solubilisation de RhBG	82
5.4 - Immunoprécipitation de RhBG	82
5.5 – Chasse radioactive de RhBG néosynthétisée	83
5.6 – Biotinylation spécifique d'un domaine cellulaire	84
5.7 - Phosphorylation in vitro de la protéine de fusion GST-Cter	84
5.7.1 - Phosphorylation par un lysat cellulaire	84
5.7.2 - Phosphorylation par des kinases purifiées	85
5.8 – Phosphorylation ex vivo	85
RESULTATS	87
1 – Expression membranaire de RhBG	88
2 - Activité de transport de NH_3 de RhBG	93
3 – Phosphorylation de RhBG	95
3.1 – Phosphorylation in vitro	95
3.1.1 – Production des protéines de fusion	95
3.1.2 – Phosphorylation par un extrait cellulaire	96
3.1.3 - Phosphorylation par des kinases purifiées	97
3.1.3.1 – Sérines S422 et S426	98
3.1.3.2 – Tyrosine Y429	100
3.2 – Phosphorylation ex vivo	101
3.2.1 - Marquage métabolique	102
3.2.2 – Anticorps anti-phosphopeptide spécifique de la tyrosine Y429	102
3.2.3 – Test fonctionnel	105
4 – Adressage et ancrage de la protéine RhBG mutée sur la tyrosine Y429	106
4.1 – Adressage à la membrane basolatérale	106

4.2 - Ancrage à la membrane	109
5 – Adressage et recyclage de la protéine RhBG mutée sur la tyrosine Y429	111
5.1 – Cellules HEK293.....	112
5.2 – Cellules MDCK	114
6 – Mutant d'accrochage à l'ankyrine G	115
7 – Adressage de la protéine RhBG dans les cellules LLC-PK1 polarisées	116
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	118
1 – Régulation de la fonction de transport de la protéine RhBG par phosphorylation	119
2 – Régulation de la fonction de transport, de l'adressage et de la stabilité membranaire de la protéine RhBG par son interaction avec l'ankyrine G	122
3 – Régulation de l'accrochage de la protéine RhBG au squelette sous-membranaire par phosphorylation de la tyrosine Y429	126
4 – Modèle de régulation de l'adressage et de la fonction de la protéine RhBG	129
5 – Régulation allostérique de la fonction des glycoprotéines Rh ?	132
6 - Autre(s) fonction(s) potentielle de la protéine RhBG	132
6.1 – Récepteur à l'ammonium	132
6.2 – Implication dans diverses pathologies rénales.....	133
7 – Recherche de partenaires cytoplasmiques	133
BIBLIOGRAPHIE	135
ANNEXE	156

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Cter	Extrémité C-terminale
GR	Globule Rouge
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
pb	paire de base
Rh	Rhésus
RhAG	Rh-Associated Glycoprotein
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

INTRODUCTION

1 – La famille Rh

1.1 – Les protéines Rh érythrocytaires

1.1.1 – Généralités sur les groupes sanguins

L'étude des antigènes de groupes sanguins a débuté au XX^e siècle lorsque Landsteiner a découvert des anticorps qui agglutinaient directement les globules rouges (GR) (Landsteiner, 1900). Ce n'est qu'en 1945 que les premières anti-globulines humaines furent mises en évidence, ouvrant la voie à la découverte de nouvelles structures antigéniques à la surface des GRs (Coombs *et al.*, 1945).

À l'heure actuelle, 29 systèmes de groupes sanguins sont répertoriés et regroupent plus de 300 antigènes (Daniels *et al.*, 2003; Poole and Daniels, 2007). À des degrés divers et en fonction de leur immunogénicité et de leur fréquence phénotypique, tous ces antigènes peuvent être à l'origine de conflits immunologiques lors de transfusion sanguine, de transplantation d'organe et de la grossesse. Les antigènes de groupes sanguins localisés à la surface des GRs sont des structures polymorphes portées par des protéines ou des glycoprotéines transmembranaires, des lipides ou des sucres (Cartron and Colin, 2001). Pour la plupart de ces antigènes, leur expression n'est pas spécifiquement érythroïde, mais peut être retrouvée dans de nombreux tissus de l'organisme.

Les études structurales et fonctionnelles de ces antigènes ont révélé une très grande variété de fonctions biologiques. C'est sur la base de cette observation qu'a été établie une classification des antigènes en cinq catégories fonctionnelles (tableau 1) :

- les récepteurs
- les molécules d'adhérence
- les enzymes
- les protéines structurales
- les transporteurs et canaux

Il est à noter que certains antigènes se retrouvent dans plusieurs classes fonctionnelles : la bande 3, porteur des antigènes Diego, est à la fois un échangeur d'anion (Tanner, 1997) et une protéine structurale du GR à travers son interaction avec des protéines du squelette érythrocytaire comme l'ankyrine (Bennett, 1989).

Le système de groupe sanguin RH (Rhésus) représente un des systèmes génétiques les plus polymorphes chez l'Homme. Il joue un rôle important en médecine transfusionnelle et est, de par l'immunogénicité de ces antigènes, le système de typage sanguin le plus répandu avec le système ABO.

Tableau 1. Classification fonctionnelle des 29 principaux systèmes de groupes sanguins humainsD'après Daniels *et al.*, 2003; Poole and Daniels, 2007.

Classe Moléculaire	Symbole	Symbole ISBT	Localisation Chromosomique	Protéines ou Lipides	Masse moléculaire (kDa)	Copies/GR
Transporteurs et Canaux	DI	010	17q21	Bande 3	90	10 ⁶
	CO	015	7p14	Aquaporine-1	28/50	2.10 ⁵
	JK	009	18q11-q12	Kidd	50	15.10 ³
	RH	004	1p34-p36	Rh	30/32	2.10 ⁵
	XK	019	Xp21.1	Kx	37	-
	GIL	029	9p13	Aquaporine-3	25	2.10 ⁴
Récepteurs	FY	008	1q22-q23	DARC	35-45	15.10 ³
	KN	022	1q32	CR1	170-280	10 ³
	MNS	002	4q28-q31	GPA/B	36/20	10 ⁶ /3.10 ⁵
	CROM	021	1q32	DAF	70	6-15.10 ³
	P	003	22q11-ter	Globoside	-	10.10 ⁶
	GLOB	028	3q25	Globoside	-	-
Molécules d'adhérence	IN	023	11p13	CD44	80	5-10.10 ³
	LW	016	19p13	ICAM-4	42	3-5.10 ³
	LU	005	19q12-q13	Lu/B-CAM	78-85	1.5-4.10 ³
	XG	012	Xp22-p32	XG1/XG2	22-29	150/960
	OK	024	19p13.2	EMMPRIN	54-65	-
	JMH	026	15q23-q24	JMH/SEMA7A	75-80	-
Enzymes	ABO	001	9q34-q34.2	GlycosylTransferase	40-42	-
	H	018	19q13	GlycosylTransferase	-	-
	LE	007	19p13	GlycosylTransferase	-	-
	YT	011	17q22.1-22.3	Cartwright	160	3.10 ³
	KEL	006	7q32-q36	Kell	93	3-6.10 ³
	DO	014	12p13.1-13.2	Dombrock	54-57	-
	I	027	6p24	GlycosylTransferase	48	-
Protéines Structurales	GE	020	2q14-q21	GPC/D	32/23	2.10 ⁵
Autres	CH/RG	017	6p21.3	C4A/CAB	-	-
	SC	013	1p32-p34	Scianna	60	-
	RAPH	025	11p15	MER2	40	70-500

1.1.2 - Génétique du système RH

1.1.2.1 - Les gènes RH

Le locus *RH* se trouve sur le chromosome 1, et plus précisément en position 1p34.3-1p36.1 (Cherif-Zahar *et al.*, 1991). Ce locus est composé de deux gènes homologues *RHD* et

RHCE (96% d'identité) étroitement liés (Colin *et al.*, 1991) puisqu'ils sont organisés en tandem dans des orientations opposées (*RHD* [5'→3'] – [3'→5'] *RHCE*) (figure 1) (Suto *et al.*, 2000). Ils possèdent une structure génomique similaire, avec 10 exons répartis sur 75 kb (Cherif-Zahar *et al.*, 1994). Le gène *RHD*, le plus proche du centromère, est séparé du gène *RHCE*, plus proche du télomère, par une région d'environ 30 kb qui contient le gène *SMP1* codant un membre de la famille des 18 kDa *small membrane proteins*. Le gène *SMP1* est de même orientation que le gène *RHD* qui est entouré en 5' et 3' de deux régions de 9 kb présentant 98,6% d'homologie appelées « boîtes Rhésus » (Wagner and Flegel, 2000). Les régions 3' non codantes des gènes *SMP1* et *RHCE* se chevauchent. Les gènes *RHD* et *RHCE* forment un haplotype et sont liés génétiquement. L'intron 4 du gène *RHD* présente une délétion de 650 pb par rapport au gène *RHCE* (Arce *et al.*, 1993), alors que la séquence des autres introns ne montre que des différences minimales entre les 2 gènes, confirmant que leur forte homologie s'applique aussi aux régions non codantes.

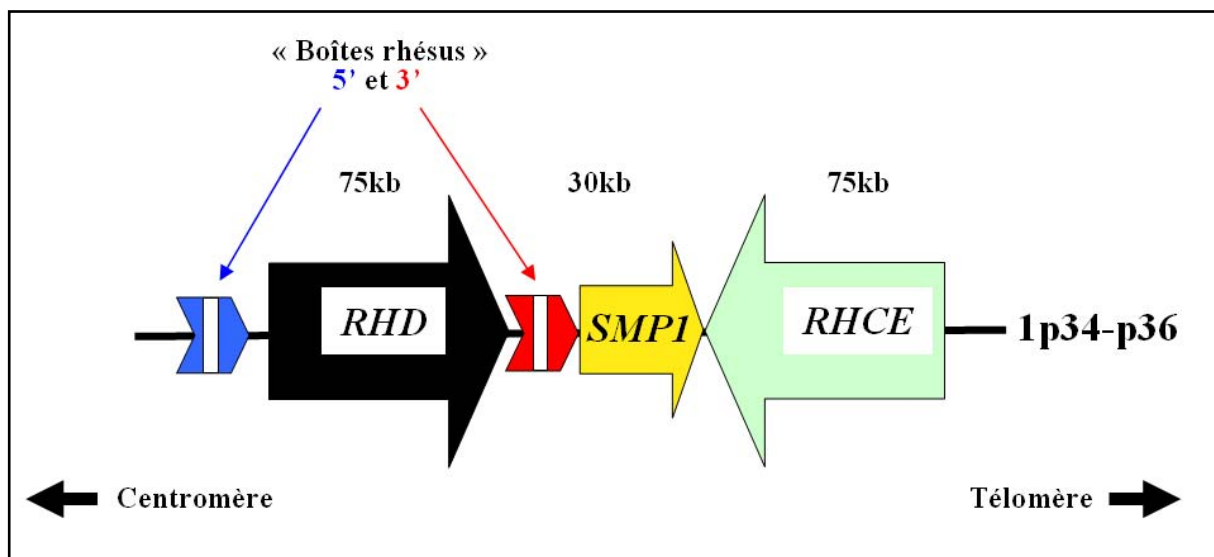


Figure 1. Organisation du locus RH.

Le locus *RH* est composé des 2 gènes *RHD* et *RHCE* orientés en tandem inversé et séparés par un autre gène, le gène *SMP1* dont la région 3' non codante chevauche la région 3' non codante du gène *RHCE* (Wagner and Flegel, 2000). Le gène *RHD* est flanqué en amont et en aval de 2 boîtes rhésus (flèches bleue en 5' et rouge en 3') hautement homologues d'approximativement 9 kb.

1.1.2.2 - Les protéines RhD et RhCE

Les protéines codées par les gènes *RHD* et *RHCE* sont des protéines membranaires palmitoylées de 417 acides aminés qui diffèrent par 36 substitutions d'acides aminés (figure 2) (Cherif-Zahar *et al.*, 1990; Le Van Kim *et al.*, 1992). Ces protéines, présentes uniquement à la surface des GRs, de poids moléculaire variant de 30 à 32 kDa, possèdent 12 domaines transmembranaires en hélice α avec des extrémités N- et C-terminales intracytoplasmiques (Avent *et al.*, 1992; Hermand *et al.*, 1993; Evers *et al.*, 1994). Ces protéines ne sont ni phosphorylées ni glycosylées (Gahmberg, 1983). Parmi les 5 résidus cystéines de la protéine RhD, deux appartiennent à des motifs Cys-Leu-Pro au point d'entrée de la protéine dans la bicouche lipidique et représentent des sites majeurs de palmitoylation. Dû à une substitution Y→C en position 311, la protéine RhCE possède trois sites d'attachement pour l'acide palmitique (Hartel-Schenk and Agre, 1992).

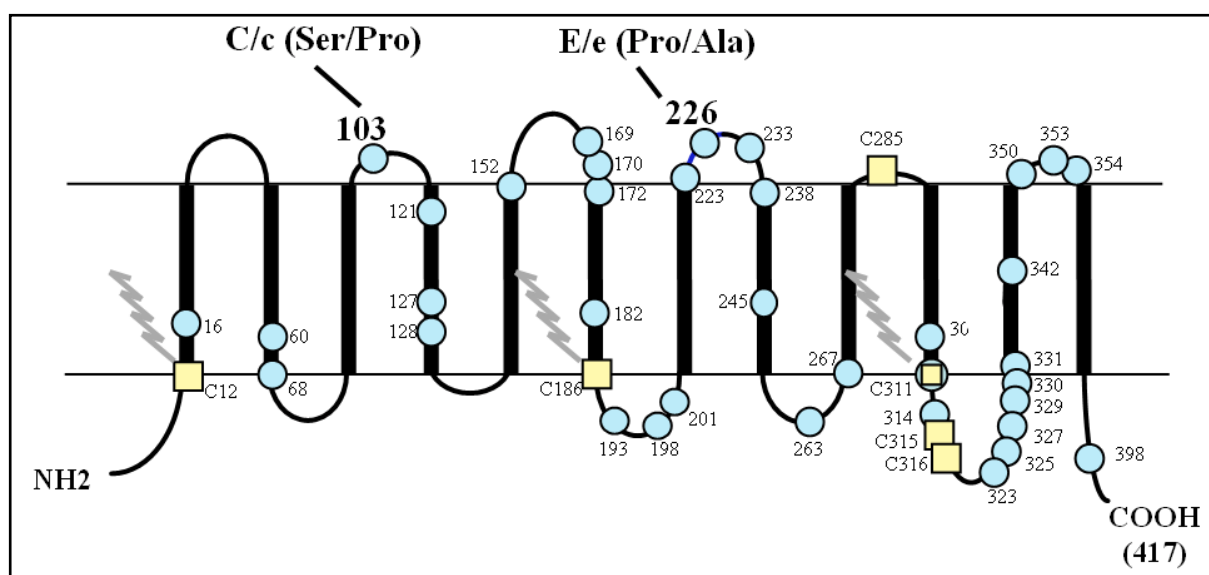


Figure 2. Représentation schématique des protéines Rh.

La protéine RhD, composée de 417 acides aminés, diffère de la protéine RhCE par 36 substitutions en acides aminés (ronds bleu clair). Les acides aminés en positions 103 (S/P) et 226 (P/A) sont responsables respectivement des polymorphismes C/c et E/e sur les polypeptides produits par le gène *RHCE*. Les résidus cystéine sont représentés par des carrés jaunes. Ils sont au nombre de 6 sur les polypeptides RhCE et 5 sur les polypeptides RhD (C311 absente). En position 12, 186 et 311 des polypeptides RhCE et en position 12 et 186 du polypeptide RhD, ces résidus constituent des sites de palmitoylation indiqués par un trait zébré gris. D'après Nicolas, 2004.

1.1.2.3 - Les polymorphismes

Le locus *RH* est très polymorphe et à ce jour plus de 55 antigènes ont été définis d'un point de vue sérologique (Daniels *et al.*, 2003). Dans la population caucasienne, le phénotype RhD positif (85% des individus) ou RhD négatif (15%) est le polymorphisme antigénique majeur du système RH qui est, la plupart du temps, lié à la présence ou non du gène *RHD* en son entier (Colin *et al.*, 1991). La délétion du gène *RHD* chez les haplotypes RhD-négatifs est probablement le résultat d'un crossing-over inégal au niveau des boîtes rhésus 3' et 5' produisant la formation d'une boîte rhésus hybride (figure 3) (Wagner and Flegel, 2000).

Dans certains cas, des sujets de phénotype RhD-négatif présentent un gène *RHD* silencieux. Cette inactivation génique est due soit à des mécanismes de conversion entre les gènes *RHD* et *RHCE* produisant des gènes hybrides, soit à des mutations non-sens (Wagner *et al.*, 2001), soit à des délétions ou à des insertions interrompant le cadre de lecture (Le Van Kim and Colin, 2004). Le phénotype RhD-négatif dans la population noire d'origine africaine est le plus souvent dû à la présence d'un pseudogène, *RHD* Ψ qui contient une duplication de 37 paires de bases au niveau de l'intron 3 et de l'exon 4, interrompant le cadre de lecture, et une série de mutations faux sens dans les exons 5 et 6 (Singleton *et al.*, 2000).

Les polymorphismes antigéniques C/c et E/e ont été établis lors des analyses de transcrits et d'ADN génomique provenant de sujets de différents phénotypes Rh (Mouro *et al.*, 1993). Ils sont respectivement associés aux substitutions Ser103Pro et Pro226Ala sur les seconde et quatrième boucles extracellulaires de la protéine RHCE (Smythe *et al.*, 1996) (figure 2). Des études d'expression ont aussi mis en évidence que les antigènes c et E étaient tous les deux exprimés après transduction d'un ADNc unique (provenant d'un allèle cE) dans des cellules de la lignée érythroïde K562, ce qui indique que les polymorphismes C/c et E/e sont portés par le même polypeptide Rh (Smythe *et al.*, 1996).

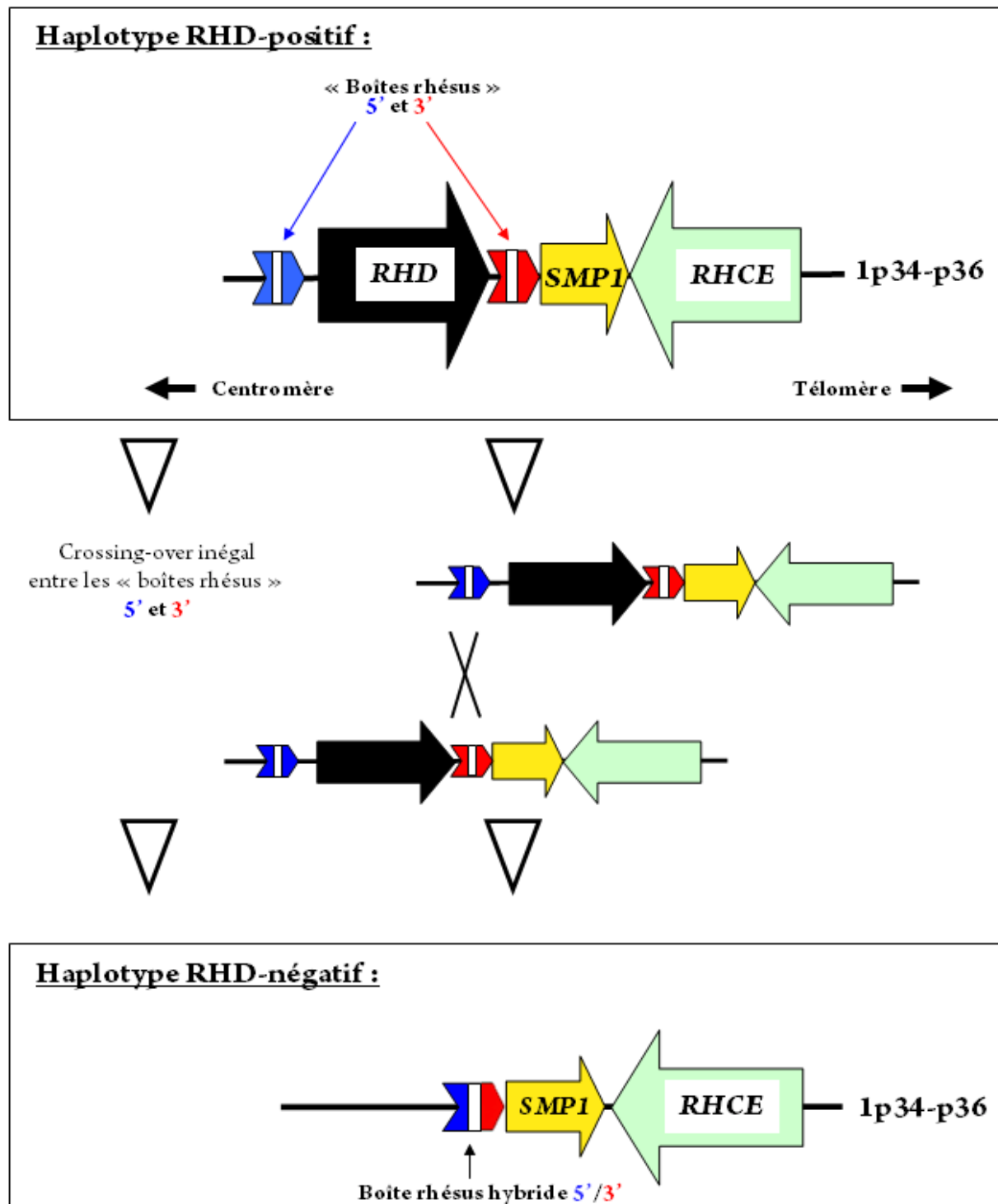


Figure 3. Polymorphisme RHD-positif/RHD-négatif dans la population caucasienne.

L'haplotype RHD-négatif présente une boîte rhésus hybride 5'/3' suggérant que la délétion du gène RHD se produit suite à un crossing-over inégal entre les boîtes rhésus 5' et 3' de deux chromosomes RHD-positif (Wagner and Flegel, 2000; Wagner *et al.*, 2001).

1.1.2.4 - Les variants

Les protéines RhD et RhCE diffèrent par 36 substitutions d'acides aminés. Les résidus responsables de la spécificité antigénique D ont été définis lors d'études d'individus D-partiels d'une part et d'autre part grâce à l'utilisation de cellules recombinantes (Liu *et al.*, 1999; Avent and Reid, 2000). Les individus D-partiels produisent des allo-anticorps anti-D et possèdent un gène normal *RHCE* mais un gène *RHD* modifié (Rouillac *et al.*, 1995; Avent *et al.*, 1996). Il existe aussi des variants appelés D-faibles dont les épitopes des antigènes D ont un faible niveau d'expression mais sont tous exprimés (Tippett, 1978). A l'heure actuelle, 66 D-faibles ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire (<http://www.uni-ulm.de/%7Efwagner/RH/RB/>).

Des variants présentant une expression faible ou partielle des antigènes C/c, E/e existent et la plupart d'entre eux ont un haplotype composé d'un gène *RHD* normal et d'un gène *RHCE* modifié (Avent and Reid, 2000). Mais contrairement au gène *RHD*, une délétion complète du gène *RHCE* n'a jamais été décrite.

Certains individus dits Rh_{null} sont dépourvus de tous les antigènes Rh, ainsi que de plusieurs autres protéines membranaires (voir ci-après).

1.1.3 - Le complexe Rh

Lors d'études d'hématies dépourvues de protéines Rh (hématies Rh_{null}), il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation suivies de western-blots réalisés à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux que l'expression de protéines, comme RhAG, CD47 et ICAM-4, était nulle ou très réduite (Le Van Kim *et al.*, 2006). De plus, dans ces mêmes hématies, l'expression de la glycophorine B (GPB) était diminuée de 60 à 70% (Dahr *et al.*, 1987). Ces résultats ont montré l'existence d'un complexe non covalent associant les protéines Rh avec les protéines RhAG, CD47, LW/ICAM-4 et GPB : le complexe Rh (figure 4).

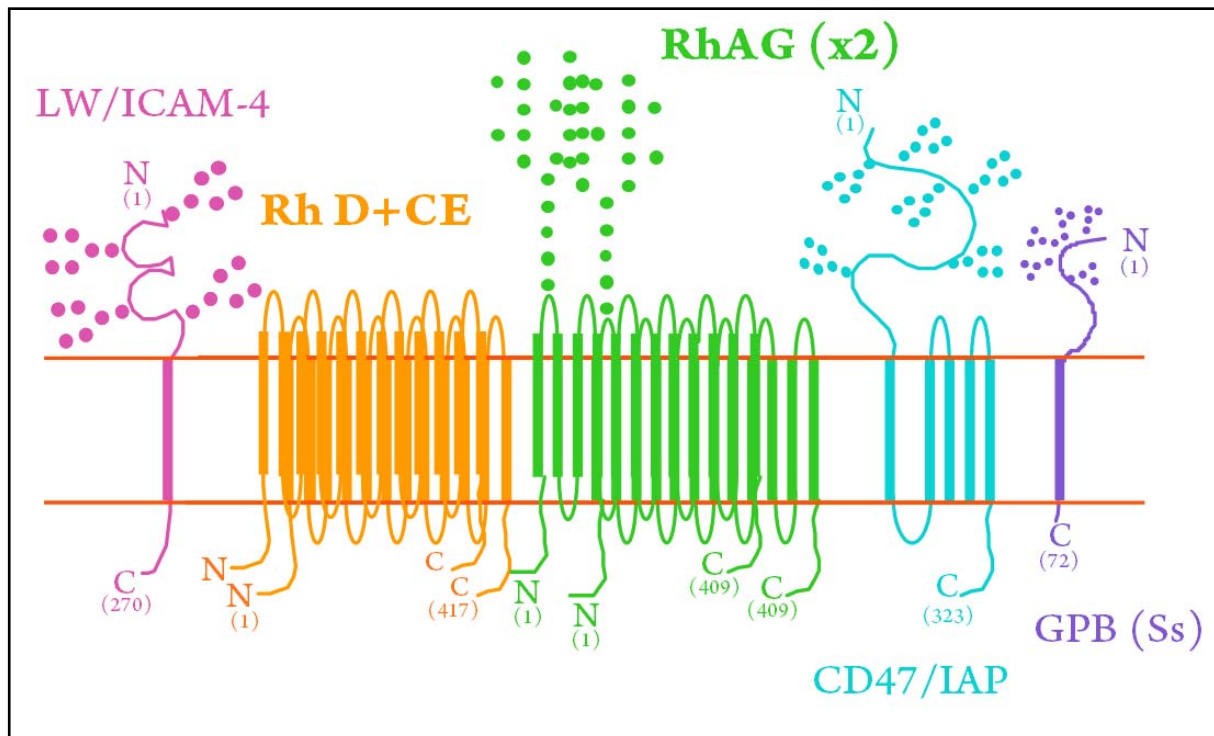


Figure 4. Le complexe membranaire Rh.

Les antigènes Rh sont présents dans la membrane du globule rouge au sein d'un complexe dont le cœur serait un tétramère composé de deux molécules Rh (D et/ou CE) et de deux molécules RhAG, auquel les protéines accessoires CD47, LW et GPB sont attachées par des liaisons non covalentes. D'après Nicolas, 2004.

1.1.3.1 – Les protéines du complexe

- RhAG : Le gène *RHAG* a été localisé sur le chromosome 6 en position 6p12-p21 (Cherif-Zahar *et al.*, 1996) et est constitué de 10 exons. La structure de ce gène en termes d'exons-introns est très similaire à celle des gènes *RHD* et *RHCE* (Huang, 1998; Matassi *et al.*, 1999), mais la vitesse d'évolution plus lente du gène *RHAG* (2,6 fois) indique une meilleure conservation, peut-être en rapport avec une fonction biologique plus importante (Matassi *et al.*, 1999). La glycoprotéine RhAG (Rh-Associated Glycoprotein) est une protéine N-glycosylée de 50 kDa et composée de 409 acides aminés (Ridgwell *et al.*, 1992). Elle présente une homologie de séquence substantielle avec les protéines Rh (32,9% et 38,5% d'identité avec RhCE et RhD, respectivement) et une structure secondaire semblable, comprenant 12 domaines transmembranaires et des extrémités N- et C-terminales intracytoplasmiques. En raison de ces homologies de structures primaire et secondaire, la protéine RhAG est classée

dans la famille Rh. En position 37, dans la première boucle extracellulaire, l'asparagine N-glycosylée porte les déterminants de groupe sanguin ABO (Moore and Green, 1987; Evers *et al.*, 1994). RhAG n'est pas palmitoylée mais contrairement aux protéines Rh, elle est phosphorylée (Hattab *et al.*, données non publiées). De plus, elle co-immunoprécipite avec les protéines Rh (Moore and Green, 1987) mais la nature de cette interaction n'a jamais été déterminée, même si ces deux protéines présentent trois et neuf motifs GXXXG, respectivement, connus pour être impliqués dans des interactions hélices-hélices et qui pourraient être importants pour le repliement des protéines et/ou des interactions protéines-protéines (Senes *et al.*, 2004).

- CD47, nommée aussi IAP (Integrin Associated Protein), représente un membre de la superfamille des immunoglobulines avec un domaine Ig-like en N-terminal, 5 domaines hydrophobes transmembranaires et enfin une extrémité C-terminale alternativement épissée d'une longueur de 3 à 36 résidus (Brown and Frazier, 2001). Seule l'isoforme 2 est exprimée dans les GRs mais les autres isoformes sont présentes dans différents tissus (Reinhold *et al.*, 1995). CD47 est fonctionnellement et physiquement associée aux intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 2\beta 1$ sur les leucocytes, plaquettes et cellules endothéliales. Dans les érythrocytes, elle se lie à la thrombospondine (TSP), une famille de glycoprotéines extracellulaires présentes dans le plasma et la matrice subendothéliale (Gao *et al.*, 1996). Le complexe CD47-TSP associé à des protéines G de la famille Gi forme un complexe de signalisation qui modulerait l'activation des plaquettes, l'adhérence et la motilité cellulaire, l'adhérence des leucocytes, la migration et la phagocytose (Brown and Frazier, 2001). CD47 se lie également à SIRP α (Signal Regulatory Protein α) empêchant ainsi la phagocytose des GRs (Oldenborg *et al.*, 2000).

- LW/ICAM-4 est une glycoprotéine de 42 kDa, à un seul domaine transmembranaire, exclusivement exprimée à la surface des GRs et qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines, puisque son extrémité N-terminale comporte deux domaines Ig-like (Bailly *et al.*, 1994). LW fut renommée ICAM-4 car elle présente une importante homologie de séquence avec les molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM) (Bailly *et al.*, 1995). Les $\beta 2$ intégrines leucocytaires LFA-1 et Mac-1 sont les premiers ligands décrits de LW. Les études de structure-fonction ont révélé que LFA-1 se lie au premier domaine Ig-like alors que le site de liaison de Mac-1 comprend les deux domaines (Hermand *et al.*, 2000). Les antigènes Rh et

LW sont liés au niveau phénotypique car l'expression de LW est plus abondante dans les érythrocytes Rh-D positifs que dans les globules rouges Rh-D négatifs et nulle dans les globules Rh_{null} (Avent and Reid, 2000).

- La glycophorine B est une protéine transmembranaire de 20 kDa portant les antigènes de groupe sanguin Ss et appartenant à la famille des protéines riches en acide sialique (qui inclut également les glycophorines A et E) qui sont exclusivement exprimées dans les lignées érythroïdes. En absence de GPB (phénotype SS-U), les GRs présentent des protéines RhAG hyper-glycosylées, suggérant un temps de transit augmenté dans l'appareil de Golgi, et donc que GPB pourrait accélérer le transit de RhAG à la surface cellulaire (Ridgwell *et al.*, 1994).

Le cœur du complexe Rh présente une taille de 170 kDa, déterminée lors d'extraction par des détergeants non ioniques (Hartel-Schenk and Agre, 1992). Ainsi, il serait constitué d'un tétramère composé de deux sous-unités Rh et deux sous-unités RhAG (Eyers *et al.*, 1994) et associé par des liaisons non covalentes aux protéines CD47, ICAM-4 et GPB. Les études génétiques désignant RhAG comme facteur de régulation post-transcriptionnelle de l'expression membranaire des protéines Rh (Cherif-Zahar *et al.*, 1996) ont été corroborées par la démonstration que RhAG jouait un rôle de chaperon moléculaire de l'ensemble du complexe Rh (Mouro-Chanteloup *et al.*, 2002).

L'association du cœur du complexe est vraisemblablement stabilisée par l'accrochage des deux domaines N- et C-terminaux de Rh et RhAG (Eyers *et al.*, 1994; Huang, 1998) au squelette érythrocytaire.

1.1.3.2 – Association au squelette membranaire du GR

Le squelette membranaire représente un réseau bidimensionnel constitué de tétramères de spectrines α et β (forme majeure dans le globule rouge), d'actine et de protéine 4.1, ainsi que des protéines dites adaptatrices sur lesquelles viennent se fixer des protéines transmembranaires, comme la protéine 4.2, la p55, la protéine 4.9, l'adducine, la tropomyosine, la myosine, la tropomoduline et l'ankyrine (figure 5). L'intégrité du squelette érythrocytaire et de ses liaisons avec des protéines membranaires est indispensable pour le

maintien des propriétés mécaniques des GRs. En effet, les anomalies morphologiques des GRs sont associées à des mutations des protéines du squelette mais aussi des protéines membranaires, qui altèrent des interactions protéines/protéines horizontales ou verticales (Delaunay, 2007). Deux sites majeurs d'interaction entre le squelette érythrocytaire et la bicouche lipidique sont très bien caractérisés. La protéine 4.1 interagit avec la protéine p55 et la glycophorine C (GPC), tandis que l'ankyrine R interagit avec la protéine 4.2 et le domaine N-terminal de l'AE1 (Bande 3) ((Bhattacharyya *et al.*, 1999; Nunomura *et al.*, 2000) et figure 5).

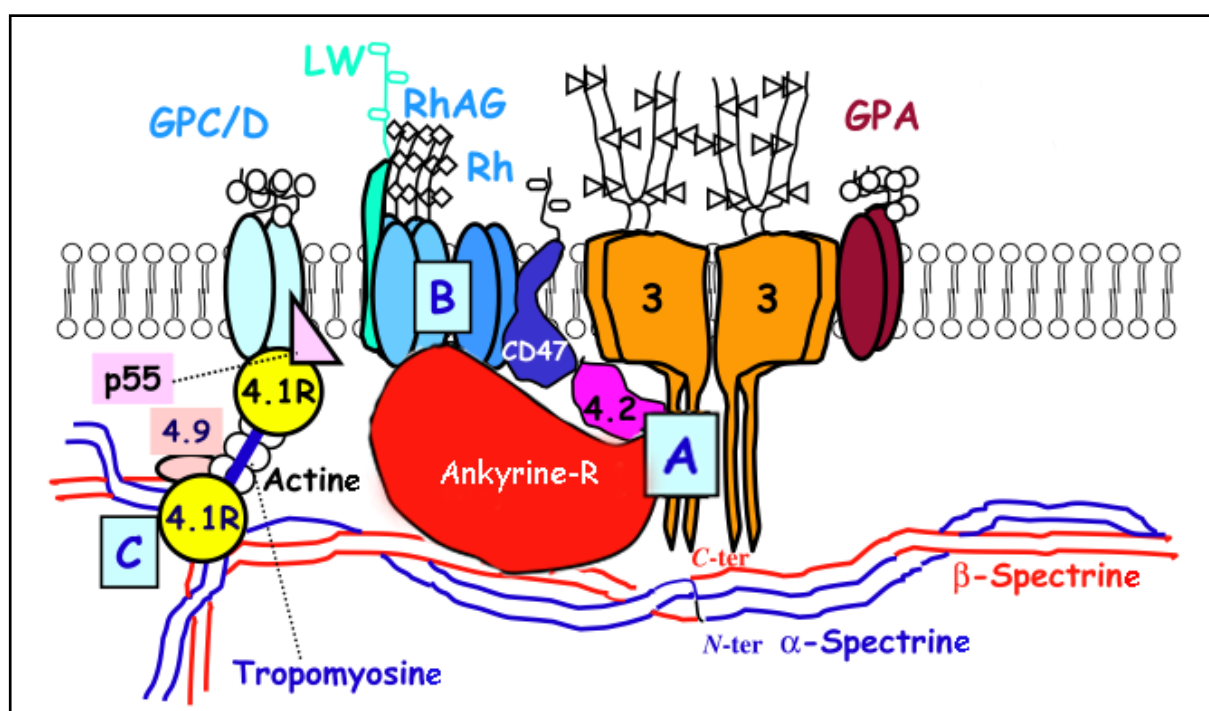


Figure 5. Représentation schématique des sites majeurs d'ancrage de la bicouche lipidique au squelette érythrocytaire.

Il existe deux types d'interactions protéiques au sein de la membrane : des interactions verticales (les complexes bande 3/ankyrine/protéine 4.2 (boîte A) et Rh/LW/CD47 (boîte B) via une interaction avec l'ankyrine R) qui assurent l'ancrage du squelette à la bicouche lipidique, et des interactions horizontales (principalement spectrine/spectrine et spectrine/protéine 4.1/actine (boîte C)) qui permettent la déformabilité du squelette. D'après Delaunay, 2007.

Les rares patients possédant des hématies Rh_{null} (à l'heure actuelle, moins de 50 cas ont été décrits) présentent une anémie hémolytique chronique de sévérité variable, une réduction de la durée de vie des hématies, une stomatosphérocytose, une fragilité osmotique anormale et

une perméabilité accrue aux cations. Les anomalies morphologiques des hématies Rh_{null} sont liées à des défauts d'expression de Rh ou RhAG et indiquent que les protéines du complexe Rh sont également cruciales pour la conservation des propriétés mécaniques des GRs (Nicolas *et al.*, 2006). De plus, les protéines Rh, RhAG et CD47 sont en grande partie résistantes à la solubilisation de la membrane par des détergents non ioniques (Ridgwell *et al.*, 1984; Gane *et al.*, 2001). Enfin, lors d'études de la microdéformabilité de la membrane de GRs suivie par fluorescence (méthode FIMD), les protéines RhAG présentaient une mobilité restreinte comme l'actine, et les protéines Rh et CD47 présentaient un comportement intermédiaire entre ceux de l'actine et de l'AE1 (Gimm *et al.*, 2000; Dahl *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats suggère une association biologique importante du complexe Rh avec le squelette des GRs. Ainsi, l'absence des protéines Rh et RhAG dans des GRs de souris *nb/nb* déficientes en ankyrine R (Nicolas *et al.*, 2003) mais également chez des patients et des souris déficients en AE1 (Bruce *et al.*, 2003) indiquait l'existence d'une association possible entre les protéines Rh, RhAG et le squelette dépendant de la spectrine via une interaction avec l'ankyrine R.

1.1.3.3 – Les ankyrines

Les ankyrines représentent une famille de protéines adaptatrices intracellulaires ubiquitaires. Elles sont impliquées dans l'adressage de nombreuses protéines vers des domaines membranaires spécialisés, aussi bien à la membrane plasmique que dans le réticulum endoplasmique (Bennett and Baines, 2001). Chez les vertébrés, trois classes distinctes ont été découvertes : l'ankyrine R (pour Restricted) qui représente la première ankyrine découverte, est exprimée de façon restreinte dans les érythrocytes mais aussi dans certains neurones et dans les muscles striés. Elle est codée par *ANK1* localisé sur le chromosome humain 8 en position 8p11. L'ankyrine B (pour Broadly) est l'ankyrine codée par *ANK2*, gène localisé sur le chromosome 4 en position 4q25-27 et est exprimée dans la plupart des cellules. Enfin, l'ankyrine G (pour taille Géante, et expression Générale) qui est aussi exprimée dans la plupart des cellules, est codée par *ANK3* localisé sur le chromosome 10 en position 10q21 (Mohler *et al.*, 2002). Les ankyrines « canoniques », dont la taille varie de 190 à 220 kDa, comprennent quatre domaines (figure 6) :

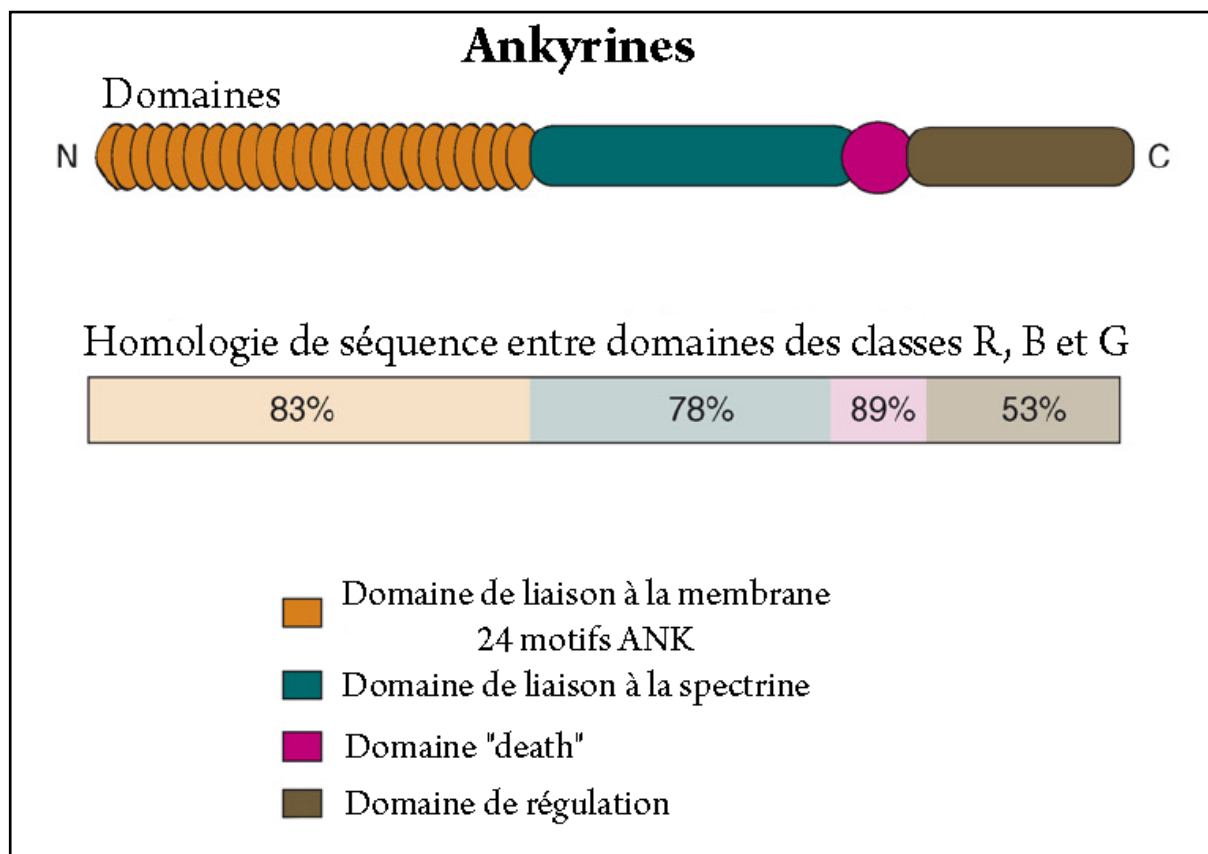


Figure 6. Représentation schématique des ankyrines.

D'après Bennett and Healy, 2008.

- un domaine de liaison à la membrane, constitué de 30% d'hélices α (Davis and Bennett, 1990) et composé de 24 motifs ANK répétés de 33 acides aminés organisés en tandem (Palek and Lambert, 1990; Bennett and Healy, 2008). Ce domaine formant ainsi une « super-hélice » de la forme d'un solénoïde est responsable de la plupart des interactions entre les ankyrines et des protéines membranaires comme les canaux ioniques, les molécules d'adhérence mais aussi des protéines cytoplasmiques : la clathrine et la tubuline (Bennett and Baines, 2001; Mohler *et al.*, 2002). Ce domaine peut s'associer à plusieurs partenaires et ainsi assembler des complexes multiprotéiques à des sites cellulaires spécifiques.

- un domaine de liaison à la spectrine qui comprend trois sous-domaines dont deux sont très conservés entre les ankyrines R et B.

- un domaine « death » dont la fonction reste inconnue à ce jour.

- un domaine C-terminal de régulation qui module les affinités d'association des domaines de liaison à la membrane et à la spectrine avec leurs protéines cibles (Hall and Bennett, 1987).

L'invalidation conditionnelle de *Ank3* (qui code l'ankyrine G) dans le cervelet de souris aboutit à une ataxie importante, une perte de la capacité à initier des potentiels d'action et à une perte de l'expression membranaire de canal à Na^+ dépendant du voltage, Nav1.6 (Zhou *et al.*, 1998; Jenkins and Bennett, 2001).

Des souris invalidées pour *Ank2* (qui code l'ankyrine B) présentent une hypoplasie du corps calleux et des faisceaux pyramidaux, des ventricules dilatés, une dégénération extensive du nerf optique et meurent après 21 jours (Scotland *et al.*, 1998). Les cardiomyocytes de ces souris ont des défauts de taux et de fréquence d'entrée du calcium et présentent des anomalies de localisation des récepteurs à la ryanodine et IP3 (Inositol TriPhosphate) (Tuvia *et al.*, 1999). Enfin, chez l'Homme, des mutations perte de fonction de *ANK2* causent une arythmie cardiaque avec des risques augmentés de mort cardiaque subite induite par un stress (Mohler *et al.*, 2003; Mohler *et al.*, 2004b), qui serait expliquée par un défaut d'organisation des complexes entre l'ankyrine B, la Na^+/K^+ ATPase, l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ et le récepteur IP_3 dans les microdomaines spécialisés des tubules-T des cardiomyocytes (Mohler *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats démontre l'importance des ankyrines dans l'expression et la fonction des protéines transmembranaires auxquelles elles sont associées.

1.1.3.4 – Interaction entre Rh/RhAG et le squelette membranaire via l'ankyrine R

De nombreuses expériences démontrent que le complexe Rh constitue un autre point d'ancrage majeur entre la bicouche lipidique et le squelette érythrocytaire. Les dernières en date montrent que les extrémités C-terminales intracytoplasmiques des protéines Rh et RhAG interagissent avec le domaine de liaison à la membrane de l'ankyrine R (Nicolas *et al.*, 2003). De plus, un acide aminé faisant partie du site de liaison à l'ankyrine est naturellement muté dans la protéine RhAG de patients Rh_{null} et *in vitro* cette mutation abolit l'interaction avec l'ankyrine, suggérant que la stomatosphérocytose de GRs Rh_{null} pourrait résulter dans certains cas, de la destruction du site de liaison du complexe Rh/ankyrine R entre la membrane du GR et le squelette dépendant de la spectrine (Nicolas *et al.*, 2003). D'autre part la liaison de la protéine CD47 au squelette érythrocytaire nécessite la présence de la protéine 4.2, protéine qui interagit avec l'AE1 (Dahl *et al.*, 2004) et l'expression des protéines Rh et de l'AE1 est diminuée dans les érythrocytes déficients en ankyrine R (Bruce *et al.*, 2003). En fonction de

ces résultats, notre unité a proposé un modèle (Nicolas *et al.*, 2003) dans lequel le complexe Rh et l'AE1, à travers leur liaison commune avec l'ankyrine R, formerait un macrocomplexe (figure 5).

1.1.4 - Les orthologues

L'étude des gènes chez les primates et l'analyse de séquences chez de nombreuses espèces incluant les mammifères, les éponges et les nématodes ont approfondi les connaissances sur l'évolution de la famille des gènes *RH* (Salvignol *et al.*, 1995; Westhoff and Wylie, 1996; Seack *et al.*, 1997). Chez certains primates et mammifères comme la souris ou la vache, un gène unique, homologue de *RHD* ou *RHCE*, est présent. Ce gène code une protéine homologue de la protéine Rh humaine. Chez les primates, seuls les chimpanzés et les gorilles possèdent l'antigène D. Chez la souris et autres mammifères inférieurs, il n'y a pas d'expression phénotypique des antigènes Rh mais les membranes érythrocytaires possèdent les protéines Rh. La présence d'homologues « *Rh-like* » chez les organismes inférieurs a été mise en évidence pour la première fois chez *C.elegans* (Wilson *et al.*, 1994). Depuis, les séquences « *Rh-like* » ont été trouvées dans des organismes unicellulaires comme *Chlamydomonas reinhardtii* (Soupene *et al.*, 2002a) ou *Nitrosomonas europaea* (Chain *et al.*, 2003), pluricellulaires comme la drosophile (Carlson, 1958) et l'éponge marine (Seack *et al.*, 1997), mais aussi chez les poissons (Nakada *et al.*, 2007) et les amphibiens (Kitano *et al.*, 1998).

1.2 – Les homologues non érythroïdes des protéines Rh

Le séquençage systématique d'EST (Expressed Sequence Tag) humains a permis de mettre en évidence deux nouveaux membres non érythroïdes de la famille Rh : RhBG et RhCG (Marini *et al.*, 2000a; Liu *et al.*, 2001). Les homologues murins Rhbg et Rhcg ont également été mis en évidence et diffèrent des gènes humains dans leur séquence et leur organisation structurale (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001).

1.2.1 – RhBG

Chez l'Homme, le gène *RHBG* est localisé sur le chromosome 1 en position 1q21.3 (Liu *et al.*, 2001) et possède une structure génique caractéristique des gènes de la famille Rh (Huang and Liu, 2001) (figure 7). La composition en GC de *RHBG* est importante (60%), comparée à celle du gène *RhAG* (43%).

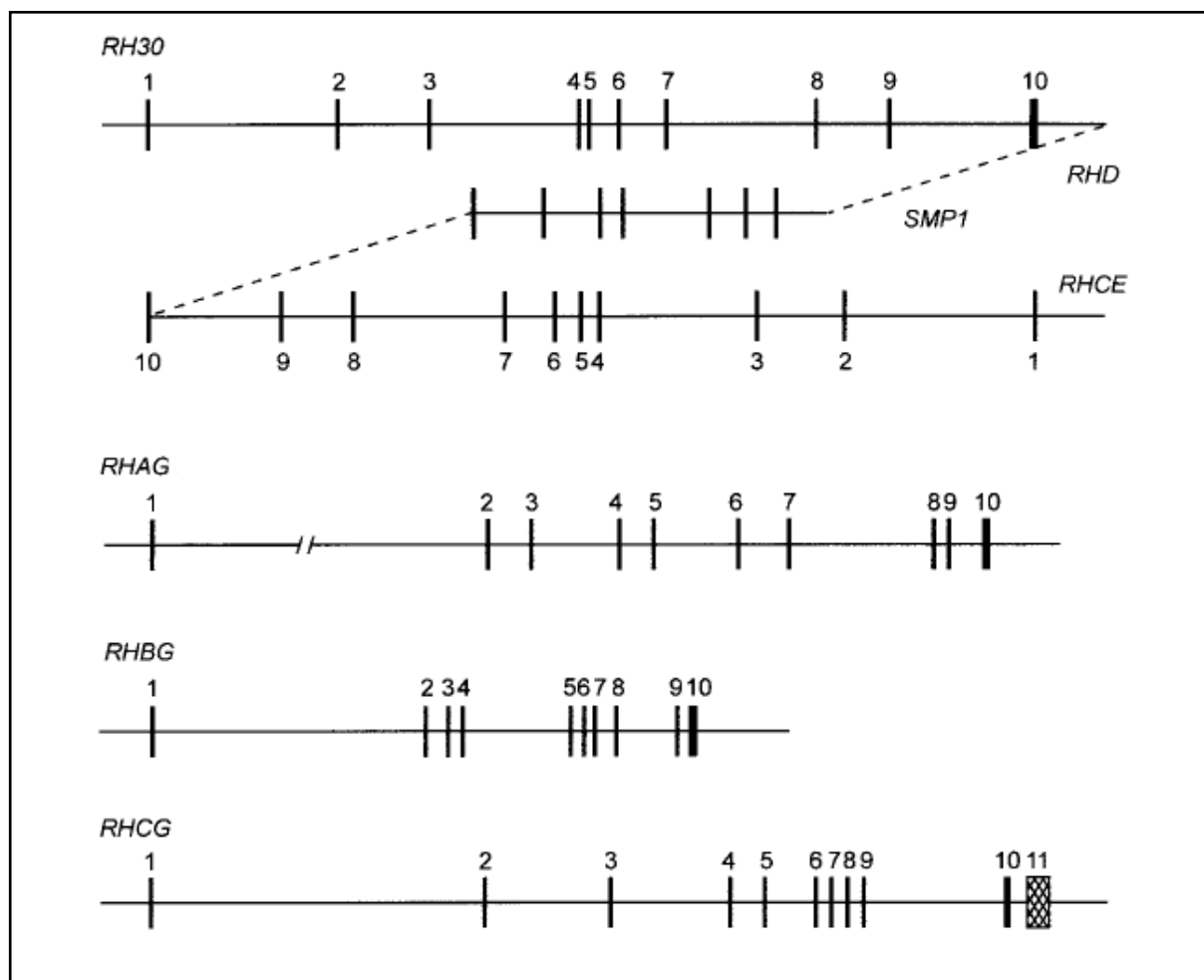


Figure 7. Organisation des exons-introns des gènes orthologues RH humains.

Le nombre d'exons de chaque gène est annoté et la taille des introns est dessinée en respectant approximativement l'échelle de distance. Il est à noter que l'exon 11 (ombragé) dans le gène *RHCG* ne contient aucune séquence traduite. D'après Huang and Liu, 2001.

L'ADNc cloné présente une phase de lecture de 1377 pb et code une protéine de 458 acides aminés dont la séquence est homologue à celles de RhAG et RhCG (46% et 52% d'identité, respectivement) (figure 8) et présente 12 domaines transmembranaires prédits avec des extrémités N- et C-terminales intracytoplasmiques. Quatre parties distinctes sont

divergentes entre ces 3 glycoprotéines : les régions N- et C-terminales, les zones aux alentours du motif NX(S/T) et la position 356-357 chez RhAG pour laquelle on peut observer un ajout d'une quinzaine d'acides aminés chez RhBG et RhCG. La protéine RhBG est N-glycosylée sur la séquence $^{49}\text{NHS}^{51}$, lui donnant une masse moléculaire apparente de 49,5 kDa. En absence de glycosylation, RhBG migre en gel SDS-PAGE à 38-40 kDa (Liu *et al.*, 2001; Quentin *et al.*, 2003). Enfin, le gène *RHBG* se trouve localisé dans une région candidate pour une forme autosomale dominante de la maladie kystique de la médullaire rénale (Christodoulou *et al.*, 1998).

RhAG	M-----RFTFPLMAIVLEIAMIVLFGFVEYET-----DQTVLEQLNITKPTDMGIFFELYPL	53
Rhag	M-----RKFPLMAISLEVAMIVLFGFVEYETPQNASQKNASHQNASQQGNTSSSAKKDQFFQLYPL	63
RhBG	MAGSPSRAAGRRRLQLPLCLFLQGATAVLFAVFRYNHKTDAALW----HR----SNHS--NADNEFYFR--YPS	63
Rhbg	MARVPRH---RRVLPLCLLFGGATALLFAIFVRYNHETDAALW----HW----GNHS--NVDNEFYFR--YPS	60
RhCG	MAWNTNL---RWRLPLTCLLLQVIMVILFGVFVRYDFAADAHWSERTHK-----NLS--DMENEFYFR--YPS	62
Rhcg	MAWNTNL---RGRLPITCLILQVTMVLFGVFVRYDIAADAHWLEKKRK-----NISSDVENEFYFR--YPS	63
RhAG	FQDVHVMIFVGFGLMTFLKKYGFSSVGINLLVAALGLQWGTIVQGILQS--QGQKFNIGIKNMINADFSAAATV	125
Rhag	FQDVHVMIFVGFGLMTFLKKYGFSSVGIFNLFLAALGLQWGTIMQGLLHS--HGKEFHFGIYNMINADFSTATV	135
RhBG	FQDVHAMVVFVGFGLMVFLQRYGFSSVGFTFLAALQWSTLVQGLFHSFHGGHIHVGVESMINADFCAGAV	136
Rhbg	FQDVHVMVVFVGFGLMVFLQRYGFSSVGFTFLVASLTQLQWATLLQGLFHSFHGGHIHVGVESLINADFCAGAV	133
RhCG	FQDVHVMVVFVGFGLMTFLQRYGFSAVGFNFLAALFGIQAALLMQGWFFHLQDRYIVVGVENLINADFCVASV	135
Rhcg	FQDVHAMVVFVGFGLMTFLQRYGFSAVGFNFLAALFGIQAALLMQGWFFHYFEEGHIVLSVENIQAADFCVASS	136
RhAG	LISFGAVLGKTSPTQMLIMTILEIVFFAHNEYLVSEIFKASDIGASMTIHAFGAYFGLAVAGILYRSGLRKGH	198
Rhag	LISFGAVLGKTSPIQMLIMTILEIAVFAGNEYLVTELFEASDTGASMTIHAFGAYFGLAVAGVLYRPGRLCEH	208
RhBG	LISFGAVLGKTGPTQLLLMALLEVVLFGINEFVLLHLLGVDRAGGSMTIHTFGAYFGLVLSRVLYRPLEKSK	209
Rhbg	LISFGAVLGKTPAQQLLLMALLEAVLFSVNEFILLSLLGVRDAGGSMTIHTFGAYFGLFLSRVLYRSQLEKSR	206
RhCG	CVAFGAVLGKVSPIQLLIMTFFQVTLFAVNEFILLNLLKVKDAGGSMTIHTFGAYFGLTVTRILYRRNLEQSK	208
Rhcg	CVAFGAVLGKVSPIQLLIMTFFQVTLFTVNEFILLNLLIEAKDAGGSMTIHTFGAYFGLTVTWILYRKNLQSK	209
RhAG	ENEEASAYYSDLFAMIGTLFLWMFWPSFNSAIAEPGDKQCRAIVNTYFSLAACVLTAFAFSSLVEHRGKLNVMH	271
Rhag	PNDESIVYHSDLFAMIGTLFLWIFWPSFNSAIADPGDHQYRAIVNTYMSLAACVITAYALSSLVERRGRDLMVH	281
RhBG	HRQGSVYHSDLFAMIGTIFLWIFWPSFNAALTALGAGQHRTALNTYSLAASTLGTFAALSALVGEDGRDLMVH	282
Rhbg	HRQSSVYNSDLFAMIGTIFLWVFWPSFNSAPTALGDGQHRTVNTYSLTASTLSTFALSALVSGDGRDLMVH	279
RhCG	ERQNSVYQSDLFAMIGTLFLWMYWPSFNSAISYHGDSQHRRAINTYCSLAACVLTSVAISSALHKKGKLDLMVH	281
Rhcg	QRQSSVYHSDLFAMIGTLFLWIYWPSFNSASSFHGDAQHRAALNTYLSLAASVLTTVTVSSIVHKKGKLDLMVH	282
RhAG	IQNATLAGGVAVGTCADMAIHPFGSMIIGSIAGMVSVLGYKFLTPLFTTKLRIHDTTCGVHNLHGLPGVVGGLA	344
Rhag	IQNATLAGGVAVGTCADMEIPLYAAMTIGSIAGIISVLGYKFFSPLLANKLMIHDTTCGVHNLHGLPGVVGGLA	354
RhBG	IQNAALAGGVVVGTSSEMMLTPFGALAGFLAGTVSTLGYKFFTPILESFKFVQDTCGVHNLHGMPGVLGALL	355
Rhbg	VQNAALAGGVVVGTSSEMMLTPFGALAGFLAGTVSTLGYKFFTPILESFRKLQDTCGVHNLHGMPGVLGAIL	352
RhCG	IQNATLAGGVAVGTAAEMMLMPYGALIIGFVCGIISTLGFVYLTPLFLESRLHIQDTCGINNLHGIPGIIGGIV	354
Rhcg	IQNATLAGGVVGTAEMMLTPYGALIVGFFCGIFSTLGFAYLTPLFLESRLRIQDTCGINNLHGIPGIIGGIV	355
RhAG	GIVAVAMGASNT-----SMAMQAA---ALGSSIGTAVVGGLMTGLILKLPWVGQPSDQ	394
Rhag	SIVAISWGMSTA-----SMAMQAA---ALGSSIGSAIVGGLLTGLILKLPWVQPPDE	404
RhBG	GVLVAGLATHEAYGD--GLQSVFPLIA--EGQRSATSQAMHQLFGLFVTLMFASVGGGLGGLLLKLPFLDSPDS	426
Rhbg	GVVVAALATHEAYGD--GLQSVFPLIA--KGQRSATSQAVYQLFGMFVTLVFASVGGSLGGLLLRPLFLDSPDS	423
RhCG	GAVTAASASLEVYGKEGLVHSFDFQGFNGDWARTQGKFQIYGLLVTLAMALMGGIIVGLILRLPFWGQPSDE	427
Rhcg	GAVTAAYSSPDYVEGPGIVHSFGFGSYKMDWNKRMQGRSQIFGLLLSLAMALVGGIIVGFILKLPFWGQAAD	428
RhAG	NCYDDSVYWKVPKTR	409
Rhag	YCYDDSVSWKVPKFRELDNRFFQHANNHVEHEV	438
RhBG	QHYEDQVHWQVPEGEHDKAQRPLRVEEADTQA	458
Rhbg	QCFEDQVYWEVPEGEQETETQRPLRGGESDTRA	455
RhCG	NCFEDAVYWEVPEGSTVYIPEDPTFKPSGSPVSPVPMVSPMASSVPLVP	479
Rhcg	NCFEDSIYWEVHEEVNTVYIPEDLAHKHSTSLVPAMPLVLPPTTSASIVPPVPTPPVSLATSAPSAAALVH	498

Figure 8. Alignement de séquence des protéines humaines (RhAG, RhBG et RhCG) et murines (Rhag, Rhbg et Rhcg).

Les acides aminés identiques sont surlignés en jaune. Ceux qui sont similaires sont écrits en rouge ou surlignés en vert. L'insertion d'une séquence ⁸AAG¹⁰ pour la protéine RhBG humaine est indiquée par des points bleus. La barre bleue indique la position des N-glycosylations (séquence NX(S/T)). D'après Liu *et al.*, 2001.

1.2.2 – RhCG

Le gène *RHCG* (ou *RhGK* pour Rh Glycoprotein Kidney) humain est localisé sur le chromosome 15 en position 15q25 et est composé de 11 exons, l'exon 11 n'étant pas traduit (Liu *et al.*, 2000) (figure 7). Comme *RHBG*, la composition en GC du gène *RHCG* est plus importante que celle du gène *RHAG* (58% contre 43%). La protéine RhCG est composée de

479 acides aminés et est N-glycosylée en position ⁴⁸NLS⁵¹ (figure 8). Sa masse moléculaire apparente est ainsi de 53 kDa et est également prédite à 12 domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminales intracytoplasmiques (Liu *et al.*, 2000).

1.2.3 – Localisation cellulaire de RhBG et RhCG

Le transcrit RHBG est exprimé dans le rein, le foie, la peau et les ovaires (Liu *et al.*, 2001), alors que le transcrit RHCG est exprimé dans le rein, les testicules, le cerveau, le pancréas et la prostate (Liu *et al.*, 2000). Chez la souris, les protéines Rhbg et Rhcg s'expriment aussi dans le foie, le rein et le tractus intestinal (Verlander *et al.*, 2003; Weiner *et al.*, 2003; Handlogten *et al.*, 2005b). Ces trois organes sont des sites prépondérants dans la production et l'excrétion d'ammonium. Des études phylogénétiques ont mis en évidence que les membres de la famille Rh (Rh, RhAG, RhBG et RhCG) présentent une homologie de séquence avec les transporteurs d'ammonium Mep/Amt très conservés chez les eubactéries, les archaebactéries, les champignons, les plantes et les invertébrés (Marini *et al.*, 1997b; Huang and Liu, 2001; Huang and Peng, 2005). Ainsi, ces premières études suggéraient que les protéines de la famille Rh pourraient être les membres mammifères d'une superfamille de transporteurs d'ammonium Amt/Mep/Rh (figure 9).

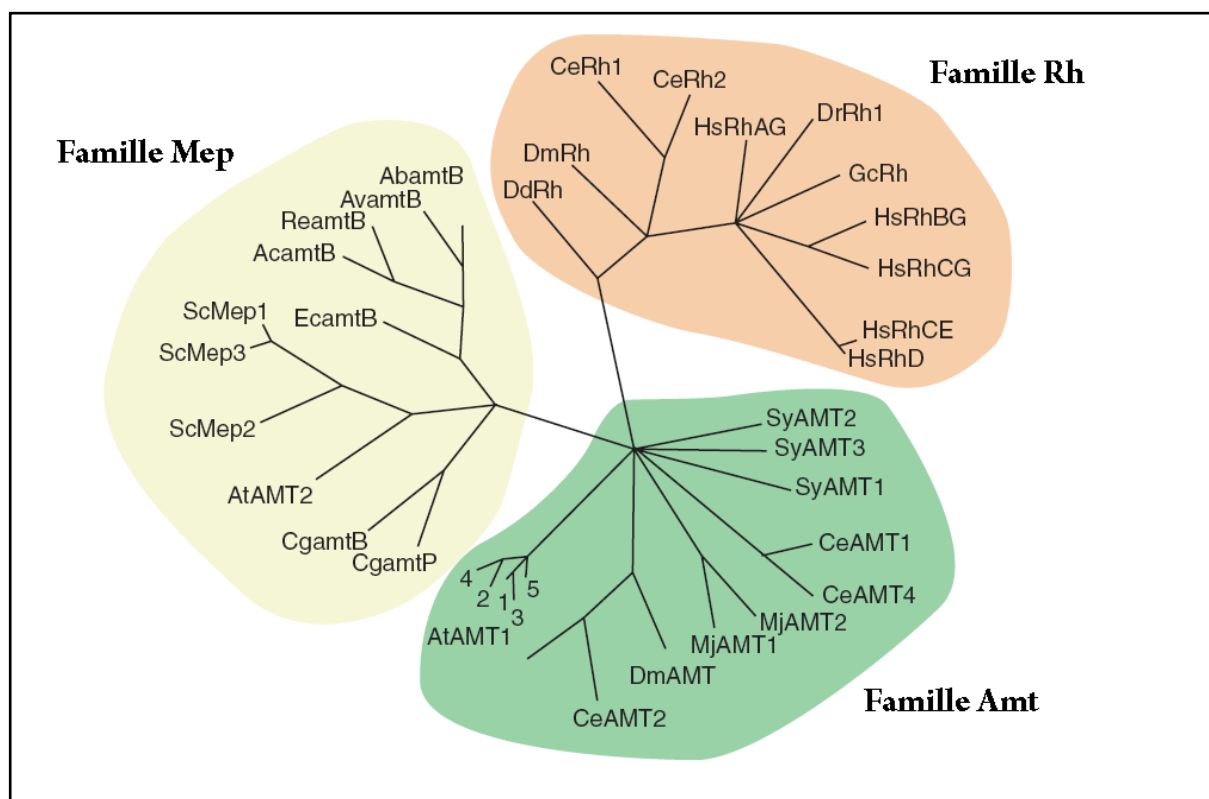


Figure 9. Représentation de la superfamille Amt/Mep/Rh.

L'alignement de séquence a été créé grâce au programme ClustalW. L'analyse phylogénétique a été réalisée grâce au programme PAUP 4.0b4a. Les séquences des extrémités N- et C-terminales qui sont hautement variables, ont été supprimées avant l'analyse. D'après Ludewig et al., 2001.

2 - Les transporteurs d'ammonium

Le transport d'ammonium à travers les membranes biologiques est un processus physiologique indispensable pour le métabolisme de l'azote dans tous les organismes vivants (Broach *et al.*, 1976; Knepper *et al.*, 1989; Nawata *et al.*, 2007).

Le terme ammonium est utilisé lorsqu'aucune distinction n'est faite entre les ions ammonium et l'ammoniaque. Les symboles chimiques pour l'ammoniaque (NH_3) et les ions ammonium (NH_4^+) sont utilisés pour faire une distinction entre ces deux formes.

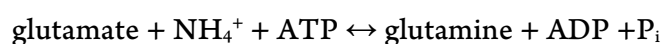
2.1 - La famille Mep

2.1.1 - Du gène *mep* à la protéine Mep

Les micro-organismes ont la capacité d'utiliser une variété de composés azotés comme source d'azote cellulaire mais l'ammonium est considéré comme un des substrats préférés (Wiame *et al.*, 1985). Une fois dans la cellule, l'ammonium peut suivre deux voies : il peut d'une part réagir avec l' α -cétooglutarate (α -KG) pour produire du glutamate grâce à la glutamate déshydrogénase :



D'autre part il peut se combiner avec le glutamate pour produire de la glutamine. Cette réaction est médiée par la glutamine synthétase (GS) :



La fonction amine du glutamate est la source de 85% de l'azote cellulaire alors que le groupement amide de la glutamine représente les 15% restants (Magasanik and Kaiser, 2002).

L'entrée d'ammonium dans certains micro-organismes est réalisée grâce aux protéines Meps. Ces protéines ont été principalement étudiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Marini *et al.*, 1994; Marini *et al.*, 1997a; Marini and Andre, 2000; Marini *et al.*, 2000b; Van Nuland *et al.*, 2006; Boeckstaens *et al.*, 2007) mais ont aussi été découvertes chez *Aspergillus nidulans* (Monahan *et al.*, 2002a), *Candida albicans* (Biswas and Morschhauser, 2005) et récemment chez *Fusarium fujikuroi* (Teichert *et al.*, 2008). Des mutations ont permis de mettre en évidence deux systèmes responsables de l'entrée de méthylammonium (MA) ou d'ammonium chez *S. cerevisiae* : les mutations du gène *mep2* abolissent l'activité de transport de MA de haute affinité mais de faible capacité, alors que les mutations du gène *mep1* détériorent un système de faible affinité mais de forte capacité (Dubois and Grenson, 1979). Un troisième gène existe : *mep3* qui présente le moins d'affinité pour l'ammonium (Marini *et al.*, 1997a). Les produits des gènes *mep* sont des protéines hautement hydrophobes à 11 domaines

transmembranaires, de 54 kDa, avec une extrémité N-terminale extracytoplasmique et une extrémité C-terminale intracytoplasmique. Seule la protéine Mep2 est N-glycosylée en position N-terminale (Marini and Andre, 2000). Une souche de *S. cerevisiae* dans laquelle sont absents les 3 gènes *mep* ne peut croître sur milieu contenant moins de 5 mM d'ammonium comme seule source azotée, alors que la présence d'une des trois protéines Meps permet à la cellule de croître de nouveau (Marini *et al.*, 1997a). Ainsi a été démontrée la capacité des protéines Meps à transporter l'ammonium et il semblerait par ailleurs que la forme transportée soit plus particulièrement le NH_3 (Soupene *et al.*, 2001).

2.1.2 - Mep et la signalisation

En réponse à une limitation d'apports en nutriments, la protéine Mep2, en plus de son rôle de transporteur d'ammonium, est nécessaire à la différenciation de certaines levures et champignons, d'une forme cellulaire à une croissance filamenteuse multicellulaire (Lorenz and Heitman, 1998; Javelle *et al.*, 2003; Biswas and Morschhauser, 2005) qui peut être pathogène (Madhani and Fink, 1998) (figure 10).

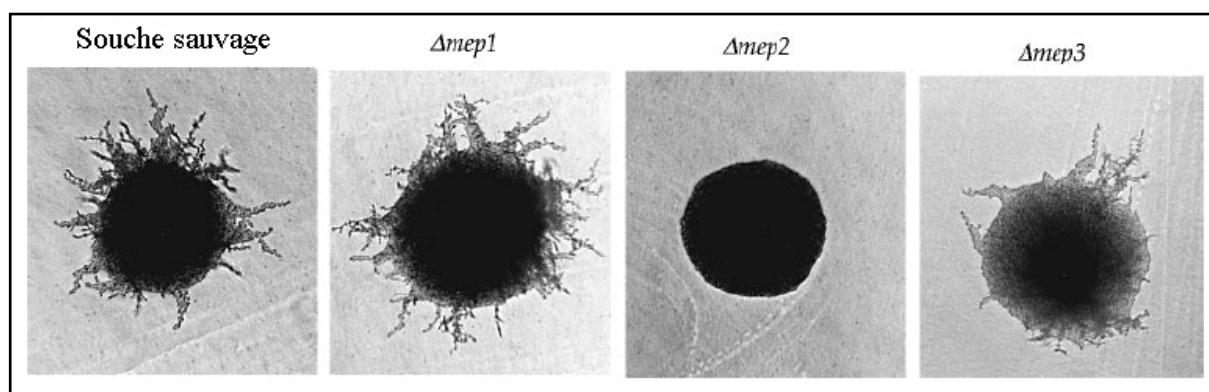


Figure 10. Mep2 est nécessaire à la croissance filamenteuse.

Les souches de *S. cerevisiae* ont été incubées sur milieu pauvre en azote 4 jours à 30°C. D'après Lorenz and Heitman, 1998.

Ce changement de forme est une stratégie pour augmenter l'exploration du milieu en recherche de substrat et ainsi augmenter la capacité de ces organismes à récupérer les nutriments (Lengeler *et al.*, 2000). En effet, chez *S. cerevisiae*, dans des conditions limitantes en ammonium, Mep2 est un senseur d'ammonium qui génère un signal intracellulaire

permettant la croissance filamenteuse (Lorenz and Heitman, 1998). Chez *C. albicans*, en absence ou présence de faible quantité d'ammonium, Mep2 est impliquée dans la signalisation, alors que lorsque la concentration en ammonium est élevée, elle est impliquée dans le transport (Biswas and Morschhauser, 2005).

2.1.3 - Régulations de Mep

Le signal pour la croissance filamenteuse semble être activé par la phosphorylation d'une thréonine en position 288 par la Protéine Kinase A (PKA). Chez *S. cerevisiae*, une mutation qui abolit toute phosphorylation (T288A) permet au triple mutant *mep1mep2mep3* de pousser sur milieu pauvre en ammonium. Par contre, la cellule ne peut se différencier (Smith *et al.*, 2003). D'autres travaux ont confirmé que le signal envoyé à la cellule pour la croissance filamenteuse est médié par la voie PKA (Lorenz and Heitman, 1998; Biswas and Morschhauser, 2005; Van Nuland *et al.*, 2006). Par ailleurs, lorsque l'on croise une souche de *S. cerevisiae* qui exprime Mep1 mutée dans son extrémité C-terminale (G413D) et incapable de croître sur milieu pauvre en ammonium, avec une souche qui exprime une protéine Mep3 fonctionnelle, on obtient une souche incapable de croître sur ce même milieu (Marini *et al.*, 2000b). Une mutation identique chez Mep3 entraîne la perte d'activité d'une protéine Mep3 native. Il semblerait que les protéines Meps mutées inhibent *in trans* des protéines natives, suggérant ainsi une interaction directe entre elles. Cette interaction hypothétique n'est pas indispensable pour la cellule puisque lorsque ces protéines sont exprimées seules, elles sont fonctionnellement actives.

Chaque gène *mep* possède plusieurs séquences GATA (5'-GAT(A/T)A-3') localisées dans son promoteur, elles permettent la fixation d'activateurs de la transcription, Gln3 et Ntl1 (Marini *et al.*, 1997a; Magasanik and Kaiser, 2002). En effet, en présence d'une faible quantité d'ammonium, la transcription des gènes *mep* est activée afin de permettre à *S. cerevisiae* d'incorporer au maximum le substrat azoté présent.

2.2 - La famille Amt

2.2.1 - Du gène *amt* à la protéine Amt

Tout comme les protéines Meps, les protéines Amts possèdent 11 domaines transmembranaires avec une extrémité C-terminale toujours intracytoplasmique (Marini and Andre, 2000; Thomas *et al.*, 2000b). Elles sont retrouvées chez les bactéries, archaebactéries, nématodes et les plantes et font une longueur variant de 400 à 500 acides aminés. Dans certains cas, par exemple chez *Caenorhabditis elegans*, la queue C-terminale est très longue et peut augmenter la taille de la protéine à plus de 500 acides aminés (Javelle *et al.*, 2004). Presque toutes les bactéries et archaebactéries codent au moins une protéine Amt. La protéine la plus étudiée est celle issue d'*Escherichia coli* : l'AmtB. Dans la plupart des cas, le gène *amtB* est lié génétiquement au gène *glnK* qui code une protéine GlnK de transduction de signal de la famille PII et l'ensemble forme un opéron (Thomas *et al.*, 2000a; Arcondeguy *et al.*, 2001). La résolution de la structure cristallographique montre d'une part que l'AmtB est une protéine à 11 domaines transmembranaires en hélice α qui possède par ailleurs un peptide signal clivé durant sa synthèse et d'autre part, que la protéine s'associe à la membrane avec deux autres sous-unités pour former un trimère (Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Cette structure trimérique ne semble pas unique à *E. coli* puisque la structure cristallographique du transporteur d'ammonium Amt-1 d'*Archaeoglobus fulgidus* a été résolue et montre également une Amt trimérique (Andrade *et al.*, 2005), suggérant que l'ensemble des Amts se retrouve sous cette forme à la membrane bactérienne.

2.2.2 - Régulation du métabolisme azoté

Chez les procaryotes exprimant les Amts, la glutamine synthétase (GS) est la première enzyme d'assimilation de l'ammonium et est soumise à des régulations complexes. Son activité est régulée par des modifications post-traductionnelles et par des rétro-contrôles effectués par de nombreux produits de son métabolisme. En effet, GS est un dodécamère et chaque monomère peut être modifié par adénylation (Leigh and Dodsworth, 2007). Trois protéines sont impliquées dans l'état d'adénylation de GS :

- l'adényltransférase (ATase) transfère l'AMP issu de l'hydrolyse de l'ATP sur un résidu tyrosine de GS et peut enlever cet AMP par clivage protéolytique.

- GlnB, protéine allostérique, existe sous deux formes : non modifiée et uridylée. GlnB non modifiée stimule l'adénylation de GS alors que la forme uridylée stimule sa dé-adénylation (Kamberov *et al.*, 1995).

- l'Uridyltransférase (UTase) transfère l'UMP d'un UTP sur une tyrosine d'une GlnB mais peut aussi enlever cet UMP par hydrolyse (Jiang *et al.*, 1998).

En plus de ces trois protéines, α -KG et la glutamine ont été identifiés comme des effecteurs allostériques (Ninfa and Jiang, 2005). En effet, parce que ces métabolites sont un précurseur et un produit, respectivement, de l'assimilation de l'ammonium, ils vont refléter la disponibilité de l'azote cellulaire. GlnB non modifiée stimule l'adénylation de GS lorsque l'azote est en excès et que la concentration en α -KG cellulaire est faible et la glutamine élevée. À l'inverse, GlnB uridylée stimule la dé-adénylation de GS lorsque peu d'azote est présent et que la quantité d' α -KG est élevée et la glutamine faible (figure 11).

L'état de l'azote cellulaire affecte également la transcription des gènes dont les produits interviennent dans le métabolisme de l'azote (Atkinson *et al.*, 2002). L'activation et la répression de ces gènes sont coordonnées par l'action d'une protéine centrale NtrC, protéine activatrice de la transcription (Morett and Segovia, 1993). Lorsque l'apport en azote est faible, NtrC est phosphorylée en position 54 sur un acide aspartique et peut ainsi activer la transcription (Weiss and Magasanik, 1988; Arcondeguy *et al.*, 2001). Le contrôle de l'activité de NtrC est médié par NtrB qui agit comme un donneur de phosphate. Lorsque l'azote est présent en grande quantité, NtrB va déphosphoryler NtrC en présence de GlnB et d'ATP (Ninfa and Magasanik, 1986; Liu and Magasanik, 1995).

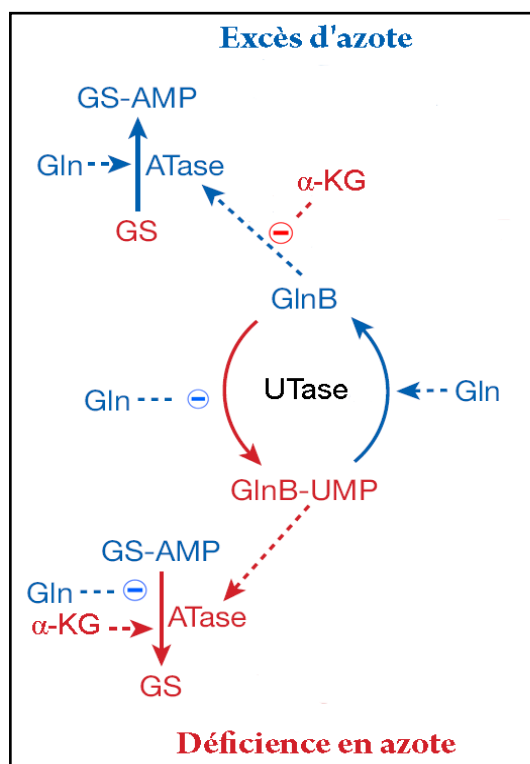


Figure 11. Régulation de la Glutamine Synthétase.

En bleu est indiquée la voie empruntée lors d'un apport suffisant en azote dans le milieu et à l'inverse, en rouge, la voie empruntée lorsque le milieu est pauvre en azote. Les lignes entières indiquent des modifications de GS et les lignes hachurées indiquent des rôles d'effecteurs ou de protéines régulatrices. Les flèches indiquent un effet positif et \ominus un effet négatif. D'après Leigh and Dodsworth, 2007.

2.2.3 - Régulation de l'AmtB

La protéine GlnK, produit de l'opéron *glnK-amtB*, joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme de l'azote. En présence d'une faible quantité d'ammonium, GlnK est uridyliée par l'UTase et est inactive. Lorsque l'apport en azote est important, GlnK est dé-uridyliée (Atkinson and Ninfa, 1999) et vient s'associer à l'AmtB à la membrane (Coutts *et al.*, 2002; Javelle *et al.*, 2004). GlnK est une protéine homotrimérique qui forme un tonneau compact dans lequel chaque monomère est composé de 4 feuillets β entourés de 2 hélices α . Trois boucles importantes sont présentes dans la structure : les boucles B, C et T. La résolution de la structure tridimensionnelle du complexe GlnK-AmtB a permis de montrer que la boucle T entraine dans le pore central de l'AmtB et l'empêchait ainsi de transporter l'ammonium (Conroy *et al.*, 2007). Cette association est impossible lorsque GlnK est uridyliée

sur la tyrosine 51 localisée dans la boucle T (Jiang *et al.*, 1998). Le mécanisme global est résumé dans la figure 12.

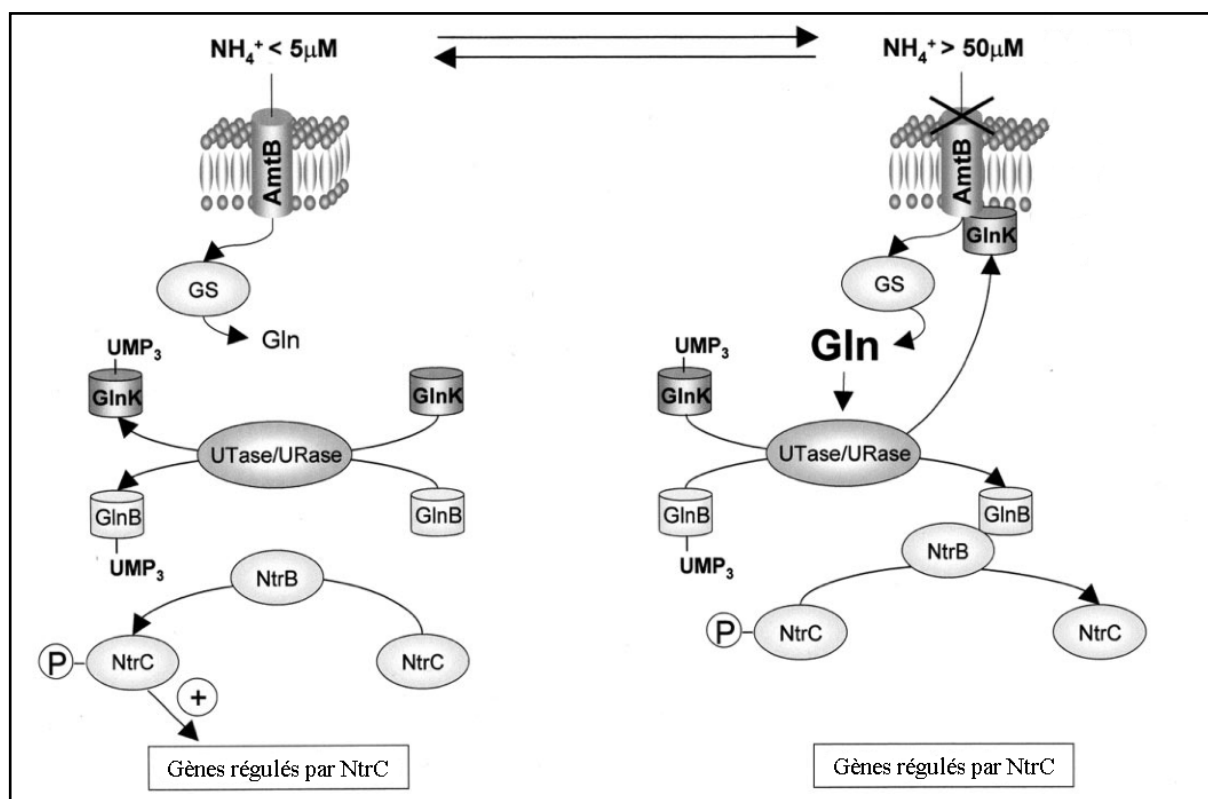


Figure 12. Modèle général de régulation du métabolisme de l'azote chez *E. coli*.

Lorsque l'apport en ammonium est faible ($< 5 \mu\text{M}$), l'AmtB transporte l'ammonium dans la cellule pour aboutir à la formation de glutamine par la glutamine synthétase (GS). Le pool de glutamine est faible, l'uridylyltransférase uridylyle GlnK et GlnB. NtrB phosphoryle NtrC qui va ainsi activer la transcription des gènes régulés par l'azote. Lorsque la concentration en ammonium extracellulaire est importante ($> 50 \mu\text{M}$), la concentration intracellulaire de glutamine est élevée, l'uridylyltransférase dé-uridylyle GlnK et GlnB. GlnK va former un complexe avec l'AmtB empêchant ainsi le transport d'ammonium. GlnB interagit avec NtrB et active son activité phosphatase, entraînant la déphosphorylation de NtrC qui ne peut activer la transcription des gènes régulés par l'azote. D'après Javelle *et al.*, 2004.

La structure cristallographique de l'Amt-1 d'*A. fulgidus* suggère que son extrémité C-terminale (Cter) interagit avec une boucle intracytoplasmique d'un monomère voisin, régulant ainsi sa fonction de transport (Andrade *et al.*, 2005). Des études chez *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence un mécanisme de régulation allostérique de l'activité des AtAMT1;1 (Loque *et al.*, 2007) et AtAMT1;2 (Neuhauser *et al.*, 2007) via une possible phosphorylation d'une thréonine dans leur Cter. En effet, il semblerait que lorsque la

thréonine 460 n'est pas phosphorylée, le Cter de chaque monomère interagit avec une boucle intracytoplasmique d'une protéine voisine du même trimère, et permet de maintenir les Amts dans une conformation favorable au transport d'ammonium. Lorsqu'une des thréonines est phosphorylée, le Cter n'interagit plus avec le monomère voisin, l'empêchant, de par un changement conformationnel, de transporter NH_4^+ (figure 13). Ce mécanisme permettrait une régulation très fine du transport et pourrait être un mécanisme général de la régulation des transporteurs Amts.

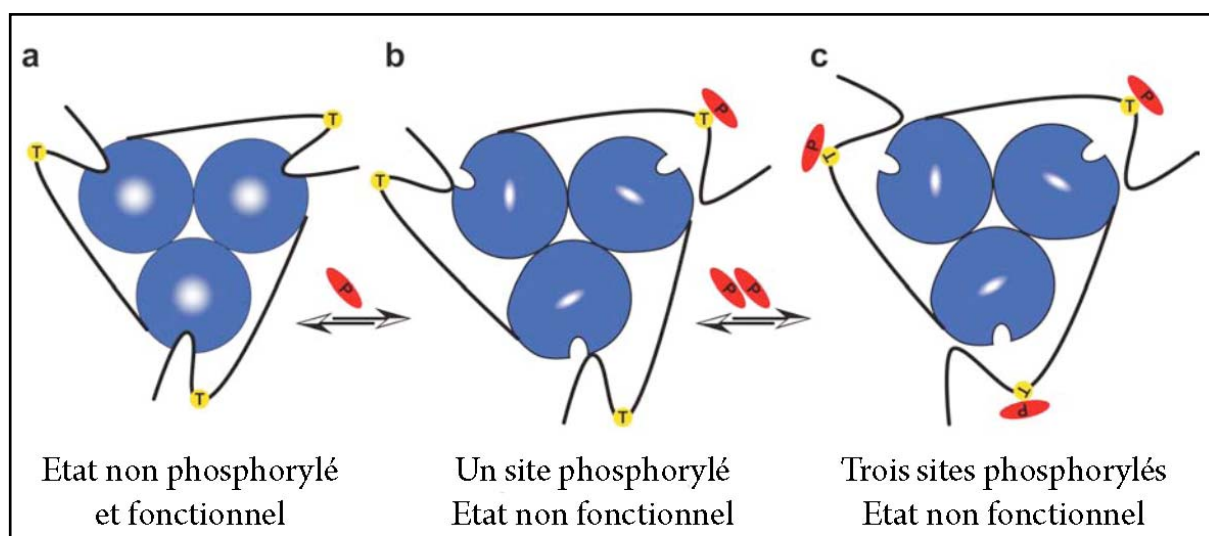


Figure 13. Représentation schématique de la régulation allostérique des AtAMTs 1;1 et 1;2.

Les protéines AtAMTs existent sous forme trimérique, chaque monomère ayant la capacité de transporter l'ammonium. AtAMT est fonctionnelle lorsque la T460 n'est pas phosphorylée, permettant au C-ter d'interagir avec le monomère voisin. La phosphorylation d'une sous-unité du trimère est suffisante pour que l'interaction n'existe plus, entraînant alors un changement conformationnel des monomères qui ne permet plus le passage de l'ammonium. D'après Loque *et al.*, 2007.

2.2.4 - Etudes du mécanisme du transport d'ammonium chez les Amts

De nombreuses études de transport ont été réalisées, mais les mécanismes proposés sont controversés. En effet, en fonction du système cellulaire dans lequel le transport est étudié et des expériences mises en œuvre, les conclusions diffèrent (tableau 2).

Tableau 2. Mécanismes de transport des protéines AmtS.D'après Javelle *et al.*, 2007.

Organismes	Protéine	Systèmes	Méthodes*	Mécanismes	Références
<i>L. esculentum</i>	Amt1;1	Ovocyte	EP	Uniport à NH_4^+ de haute affinité dépendant du $\Delta\psi$	Ludewig et al. (2002,2003)
	Amt1;2	Ovocyte	EP	Uniport à NH_4^+ de faible affinité dépendant du $\Delta\psi$	Ludewig et al. (2003)
	Amt1;1	Ovocyte/Levure	EP/ET/pH	Uniport à NH_4^+ ou cotransport à NH_3/H^+	Mayer et al. (2006a)
	Amt1;2	Ovocyte	EP/ET/pH	Uniport à NH_4^+ ou cotransport à NH_3/H^+	Mayer et al. (2006b)
<i>A. thaliana</i>	Amt1;1	Ovocyte	EP/ET/pH	Uniport à NH_4^+ ou cotransport à NH_3/H^+	Mayer and Ludewig (2006)
	Amt1;1	Ovocyte/Levure	EP/ET	Uniport à NH_4^+ ou cotransport à NH_3/H^+	Wood et al. (2006)
<i>S. typhimurium</i>	AmtB	<i>S. typhimurium</i>	TC	Canal à NH_3	Soupene et al. (2002b)
<i>E. coli</i>	AmtB	<i>E. coli</i>	ET/TC	Canal à NH_3	Soupene et al. (1998)
	AmtB	Protéoliposomes	pH	Canal à NH_3	Khademi et al. (2004)
	AmtB	<i>E. coli</i>	ET	Canal à NH_3	Javelle et al. (2005)

* : ET, Expériences de Transport en utilisant la ^{14}C -méthylamine ; pH, mesure du pH ; EP, mesures électrophysiologiques ; TC, Test de Croissance
 $\Delta\psi$, Potentiel de membrane

Des études réalisées dans des ovocytes de Xénope ont montré que le transport de NH_4^+ par les protéines AMT1;1 et AMT1;2 de *Lycopersicon esculentum* génère une augmentation du potentiel de membrane et que ces protéines seraient un uniporteur à NH_4^+ (Ludewig *et al.*, 2002; Ludewig *et al.*, 2003). Récemment, ces études ont été corroborées par des expériences de mesure d'entrée de MA radiomarké au ^{14}C dans les ovocytes exprimant des AmtS de *L. esculentum* (Mayer *et al.*, 2006a; Mayer *et al.*, 2006b) ou de *A. thaliana* (Mayer and Ludewig, 2006; Wood *et al.*, 2006), suggérant que les protéines AmtS puissent être soit des uniporteurs à NH_4^+ , soit des cotransporteurs à NH_3/H^+ . En revanche, lorsque les expériences sont réalisées *in vivo* chez *E. coli* et *S. typhimurium*, par différentes approches (test de croissance en présence ou absence des protéines AmtB, mesures d'entrée de MA radiomarké, mesure de variations de pH), il semblerait que les protéines AmtB soient des canaux à la forme non chargée NH_3 (Soupene *et al.*, 1998; Soupene *et al.*, 2002b; Khademi *et al.*, 2004; Javelle *et al.*, 2005).

2.2.5 - Structure de l'AmtB

En présence ou non d'ammonium, les structures cristallographiques de l'AmtB d'*E. coli*, ainsi que des expériences fonctionnelles indiquent que la protéine possède les caractéristiques d'un canal à NH_3 plutôt que d'un transporteur qui devrait avoir des zones flexibles impliquées dans la translocation du substrat (Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Dans le vestibule externe de l'AmtB est présent un site potentiel de fixation de NH_4^+

dont l'environnement permet sa déprotonation. Au centre de la protéine, un pore hydrophobe d'une longueur de 20 Å permet le passage de NH_3 et non de l'ion NH_4^+ (figure 14).

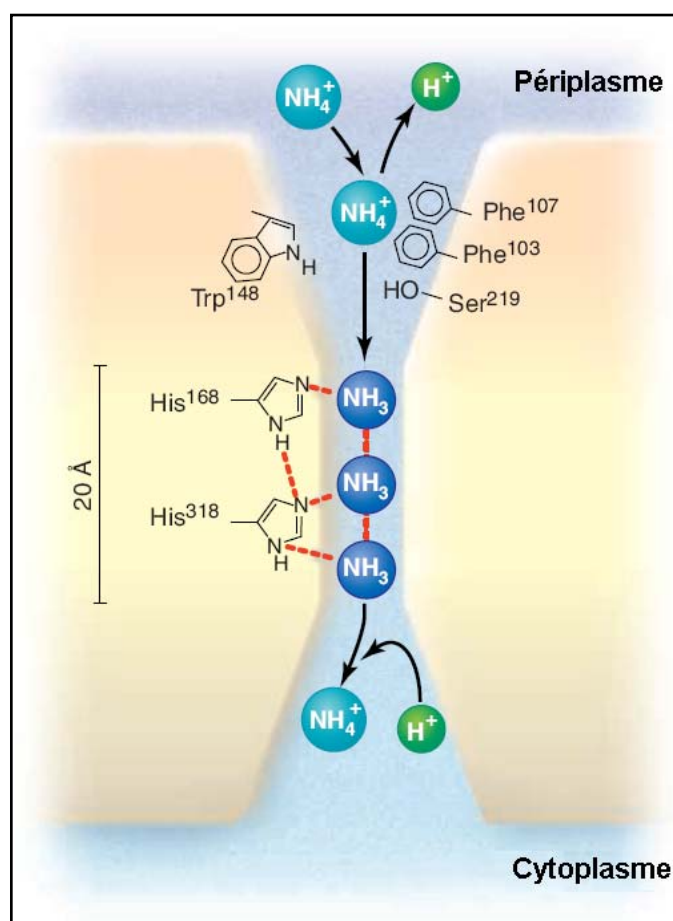


Figure 14. L'AmtB d'*E. coli*, un canal à NH_3 .

La résolution de la structure de l'AmtB révèle un vaste vestibule de chaque côté de la protéine. Dans le vestibule externe, les acides aminés qui vont stabiliser NH_4^+ et le déprotoner sont les résidus F103, F107, W148 et S219. Le canal d'une longueur de 20 Å possède deux résidus histidines : H168 et H318 qui vont stabiliser 3 molécules NH_3 via des liaisons hydrogènes. La molécule de NH_3 se reprotone dans le vestibule interne. D'après Knepper and Agre, 2004.

2.3 – Les protéines de la famille Rh, transporteurs d'ammonium ?

2.3.1 - Localisation cellulaire de RhBG et RhCG

Les protéines RhBG et RhCG humaines sont toutes deux exprimées dans le rein mais également spécifiquement dans d'autres organes : les testicules, le cerveau, le pancréas et la

prostate pour RhCG ; le foie, la peau et les ovaires pour RhBG (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001).

Contrairement aux micro-organismes et aux plantes dans lesquels l'ammonium est un composé crucial du métabolisme, chez l'Homme, l'ammonium est un produit terminal du catabolisme azoté et sert de tampon urinaire. Dans le corps humain, la production d'ammonium est principalement localisée dans le cerveau, le tractus intestinal et le rein. En solution aqueuse, l'ammonium total existe sous deux formes : la forme neutre basique NH_3 et la forme cationique monovalente acide NH_4^+ . À l'équilibre :



Tous les fluides mammifères présentent un pH toujours plus faible que le pKa de la réaction. À pH physiologique, la forme prédominante (98%) est le NH_4^+ .

2.3.1.1 - Le cerveau

Dans le cerveau, le glutamate et l'ammonium sont transformés par les astrocytes pour former la glutamine (Marcaggi and Coles, 2001) qui entre alors dans le cycle de la glutamine/glutamate. L'ammonium peut diffuser du sang vers le cerveau en traversant la barrière cervicale grâce au gradient chimique et au gradient de pH. L'augmentation de la concentration cervicale en ammonium a des effets toxiques majeurs : l'excès de NH_4^+ peut entrer dans les neurones via le canal Na^+/K^+ (Binstock and Lecar, 1969) ; cet influx entraîne alors la dépolarisation de la membrane, déstabilise l'état d'excitabilité des neurones et les réactions enzymatiques et métaboliques, affecte le pH intracellulaire et le pouvoir tampon des cellules (Planelles, 2007). La présence des transcrits RhBG et RhCG dans une lignée cellulaire hybride de neuroblastome glial NG108-15 suggère que l'excrétion de l'ammonium des cellules neuronales pourrait être médiée par les protéines RhBG et RhCG (Hillmann *et al.*, 2008).

2.3.1.2 - Le tractus intestinal et le foie

Les syndromes d'hyperammonémies résultent la plupart du temps de maladies congénitales liées aux enzymes du cycle de l'urée ou de troubles fonctionnels du foie (Szerb and Butterworth, 1992). Ils aboutissent à des neurotoxicités sévères comme l'encéphalopathie hépatique (Shawcross and Jalan, 2005). Dans des conditions normales, le foie détoxifie la production intestinale d'ammonium arrivant par la veine porte. Plusieurs grammes par jour sont produits dans le canal digestif lors de la digestion des protéines, des processus de déamination et enfin de l'hydrolyse de l'urée. L'ammonium est alors converti en urée ou en glutamine. Chez la souris, Rhbg et Rhcg sont exprimées au pôle basolatéral et apical respectivement, des cellules épithéliales de l'estomac, du jéjunum, de l'iléum et du colon, suggérant leur implication dans le transport de l'ammonium (Handlogten *et al.*, 2005b). D'autre part, Rhbg, exprimée au pôle basolatéral des hépatocytes périvénueux, pourrait permettre la capture d'ammonium et Rhcg exprimée dans les cellules épithéliales du canal biliaire pourrait contribuer à la sécrétion d'ammonium dans le fluide biliaire, afin de maintenir une concentration plasmatique en NH_4^+ de l'ordre du micromolaire et d'éviter ainsi une encéphalopathie hépatique (Weiner *et al.*, 2003; Knepper and Agre, 2004).

2.3.1.3 - Le rein

Le rein joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre acido-basique de l'organisme en maintenant le pH plasmatique entre 7,37 et 7,42. Il est composé de millions de néphrons, unités structurales et fonctionnelles qui sont divisées en quatre segments : le tubule proximal (TP), l'anse de Henle (regroupant les branches fines descendantes et ascendantes), le tubule distal (regroupant la branche large ascendante et le tubule contourné distal (TCD)) et le système collecteur (regroupant le tubule connecteur et les canaux collecteurs). Le tubule contourné distal (TCD), le tubule connecteur (TCN) et le canal collecteur (CC) sont regroupés sous le terme de néphron distal (figure 15).

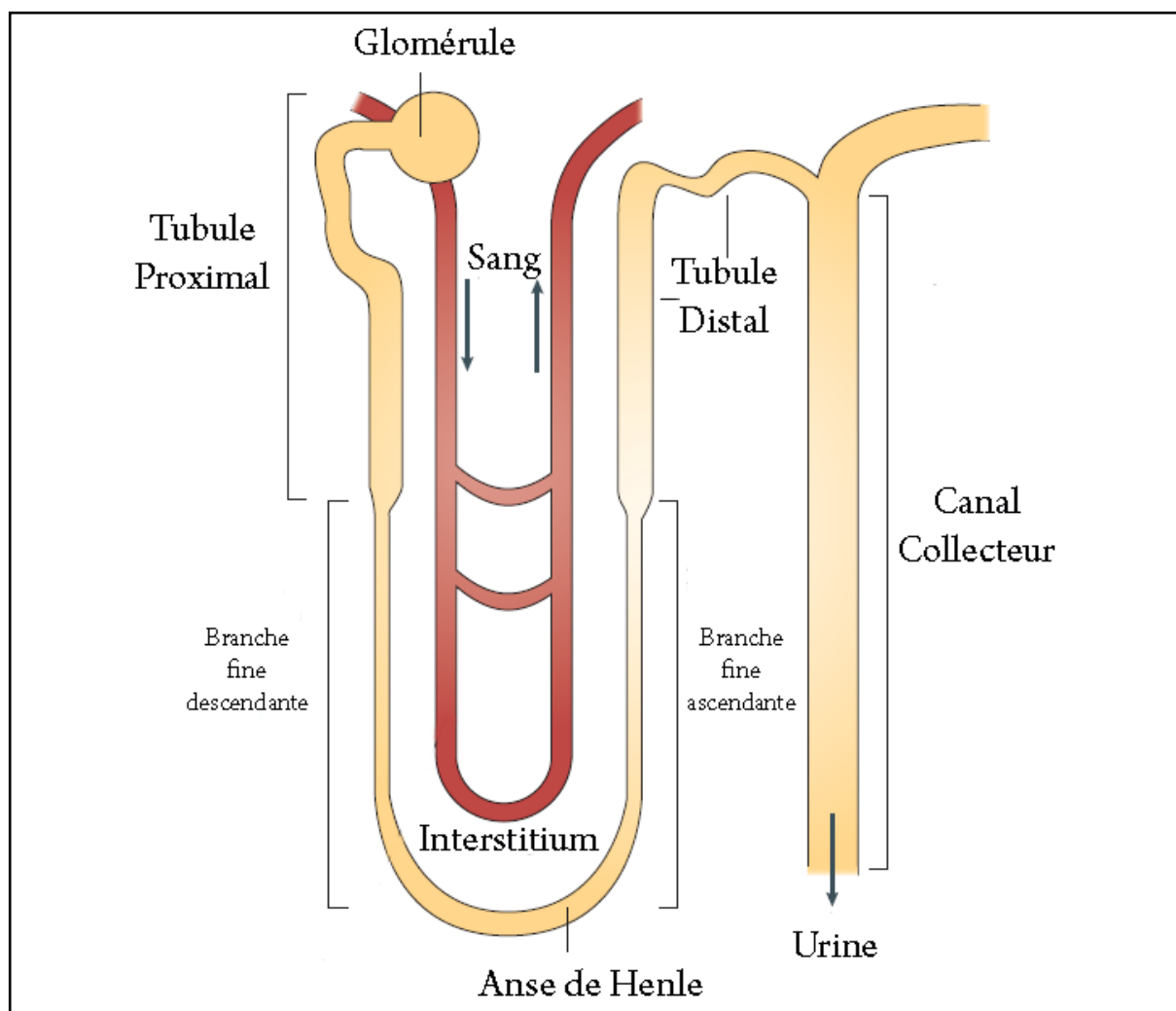


Figure 15. Schéma d'un néphron.

D'après King *et al.*, 2004.

2.3.2 - Transport d'ammonium le long du néphron

L'ammonium est un des composants principaux excrétés dans l'urine permettant au rein de réguler l'équilibre acido-basique. En effet, NH_4^+ représente les deux tiers de la charge acide excrétée dans l'urine dans des conditions normales et 90% lors d'acidose métabolique chronique (Karim *et al.*, 2005).

- Le tubule contourné proximal (TCP) est le site majeur de la sécrétion, dans le fluide tubulaire, d'ammonium (figure 16) qui est synthétisé à partir du métabolisme de la glutamine. Le transport de l'ammonium à travers les membranes apicale et basolatérale des cellules épithéliales n'est pas complètement défini. Au pôle apical, la sécrétion pourrait mettre en jeu

une activité d'échange Na^+/H^+ de l'échangeur NHE3 fonctionnant selon un mode $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ ou par couplage de l'activité Na^+/H^+ avec une diffusion de NH_3 (Good and DuBose, 1987).

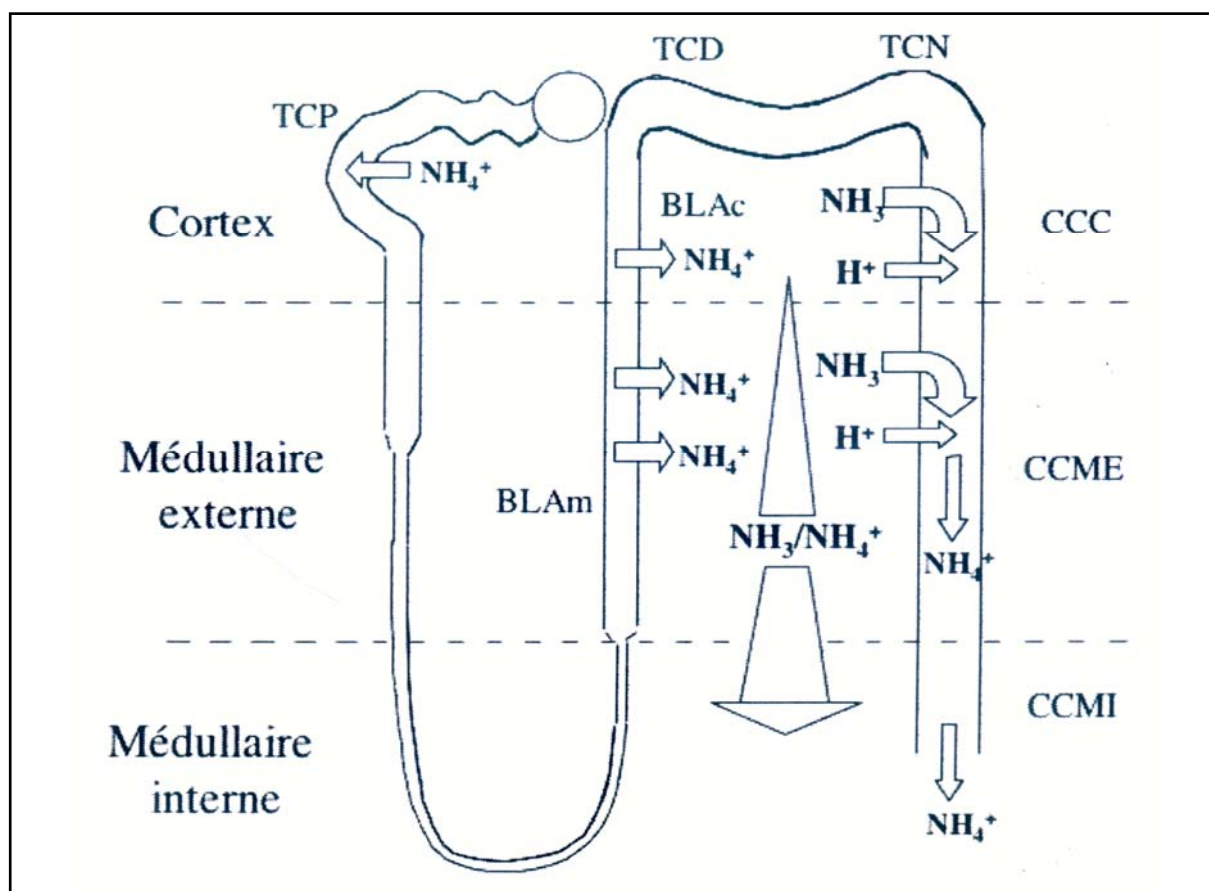


Figure 16. Schéma du transport de l'ammonium le long du néphron.

TCP, tubule contourné proximal ; BLAc, branche large ascendante corticale ; BLAm, branche large ascendante médullaire ; TCD, tubule contourné distal ; TCN, tubule connecteur ; CCC, canal collecteur cortical ; CCME, canal collecteur de la médullaire externe ; CCMI, canal collecteur de la médullaire interne. D'après Quentin, 2005.

- La Branche Large Ascendante (BLA) joue un rôle majeur dans le transport d'ammonium le long du néphron car elle est responsable de la réabsorption de la majorité de l'ammonium (figure 16). Le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ BSC1/NKCC2 est le principal transporteur de NH_4^+ au pôle apical des cellules, mais un phénomène passif de réabsorption d'ammonium intervient également (Good *et al.*, 1984; Good, 1988). Au pôle basolatéral des cellules, le mécanisme reste inconnu mais les échangeurs Na^+/H^+ NHE1 et NHE4 exprimés à la membrane pourraient être responsables de l'efflux d'ammonium.

- Le canal collecteur est un site important de sécrétion d'ammonium dans l'urine. L'accumulation de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans l'interstitium médullaire ainsi que la différence de pH entre l'interstitium et la lumière conduisent à la formation d'un gradient favorable à la diffusion de NH_3 vers le canal collecteur (figure 16). Différentes catégories de cellules y sont retrouvées : les cellules principales qui expriment au pôle basolatéral la Na^+/K^+ ATPase et les cellules intercalaires. Ce sont ces dernières qui sont responsables de l'équilibre acido-basique dans le canal collecteur. Deux types de cellules intercalaires ont été décrits à ce jour bien que des formes intermédiaires peuvent être occasionnellement observées (Emmons and Kurtz, 1994; Teng-umnuay *et al.*, 1996). La sécrétion de protons dans la lumière tubulaire entraînant l'acidification de l'urine est assurée par les cellules intercalaires de type A. Cette fonction est réalisée grâce à la H^+ -ATPase dont l'expression d'une de ses sous-unités est régulée par l'état acide-base (Bastani, 1995). En effet, plus le pH est acide, plus le nombre de cellules exprimant la pompe H^+ -ATPase au pôle apical est important. L'échangeur d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE1 est inséré dans la membrane basolatérale et assure la sortie de bicarbonate de la cellule vers l'interstitium et est nécessaire à la sécrétion de protons (Friedlander, 2005). La situation est presque symétrique dans les cellules intercalaires de type B puisque la H^+ -ATPase est retrouvée au pôle basolatéral, alors que l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est localisé au pôle apical. La différence avec les cellules de type A se situe dans la nature de l'échangeur d'anions puisque dans le cas des cellules de type B, la pendrine joue ce rôle (figure 17).

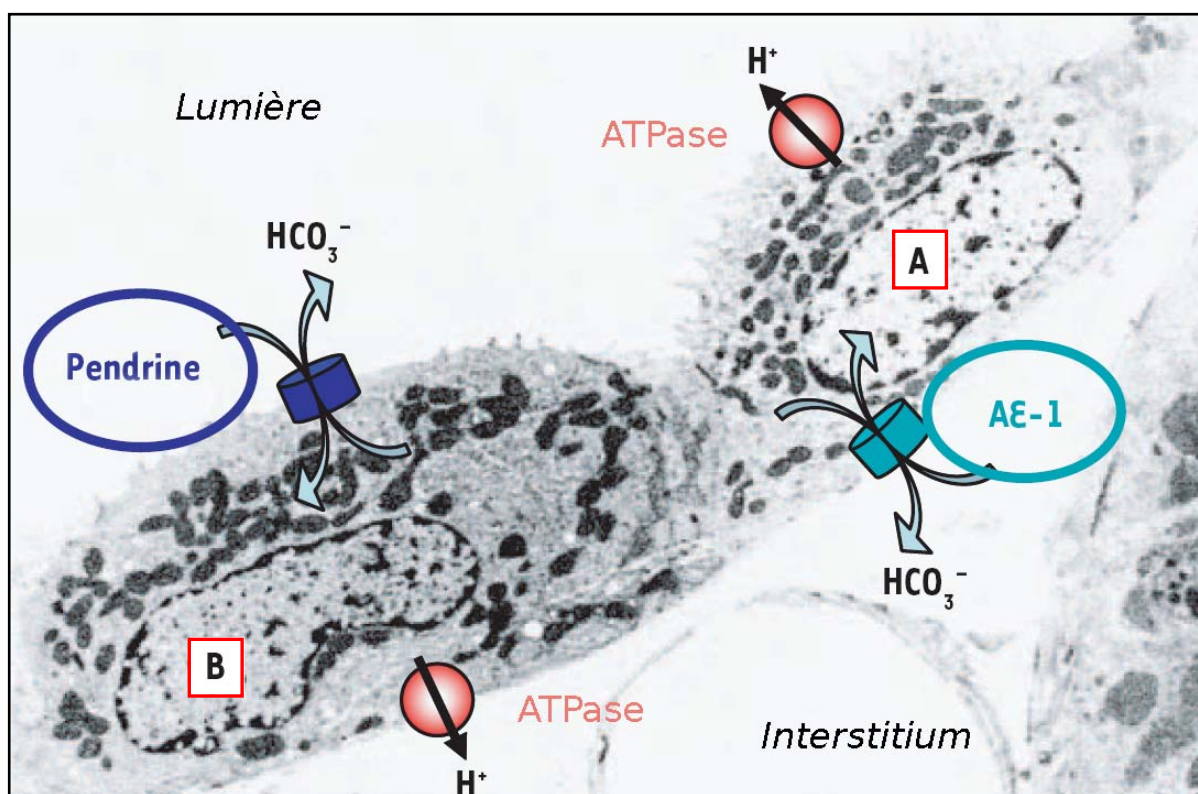


Figure 17. Principaux transporteurs dans les cellules intercalaires

Représentation des principaux transporteurs des cellules intercalaires de type A et B vues en microscopie électronique de transmission. D'après Friedlander, 2005.

Jusque récemment, les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée d'ammonium dans les cellules du canal collecteur étaient mal connus. En effet, le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ BSC2 (Ginns *et al.*, 1996) et la Na^+/K^+ ATPase étaient suspectés (Wall, 1997). Avant la découverte de la localisation des protéines RhBG et RhCG dans des sites importants pour la production et l'excrétion d'ammonium, il était supposé que la forme non chargée NH_3 traversait l'épithélium par diffusion passive à travers les membranes des cellules et qu'à l'inverse, le transport de la forme chargée NH_4^+ nécessitait l'intervention de transporteurs membranaires. Cependant la perméabilité au NH_3 de certaines cellules du canal collecteur rénal (Flessner *et al.*, 1991), des glandes gastriques (Waisbren *et al.*, 1994a) et des cryptes du colon (Waisbren *et al.*, 1994b) est très faible. Ces résultats suggéraient l'existence dans certaines cellules épithéliales de protéines impliquées dans la diffusion de NH_3 à travers la membrane cellulaire.

La découverte de l'expression de RhBG au pôle basolatéral et RhCG au pôle apical des mêmes cellules des tubules connecteurs et des cellules intercalaires de type A des canaux collecteurs corticaux et médullaires de rat ((Eladari *et al.*, 2002; Quentin *et al.*, 2003) et figure 18), ainsi que l'expression polarisée de ces glycoprotéines dans des cellules du canal collecteur de souris (Handlogten *et al.*, 2004, , 2005a), laissent penser que ces protéines jouent un rôle important dans le transport d'ammonium. RhBG et RhCG pourraient accélérer l'entrée et la sortie, respectivement, de NH_3 dans ces cellules, puisque la diffusion à travers la bicouche lipidique de NH_3 dans les canaux collecteurs pourrait être trop lente pour supporter le taux élevé de NH_3 à transporter dans cette région du néphron (Knepper and Agre, 2004).

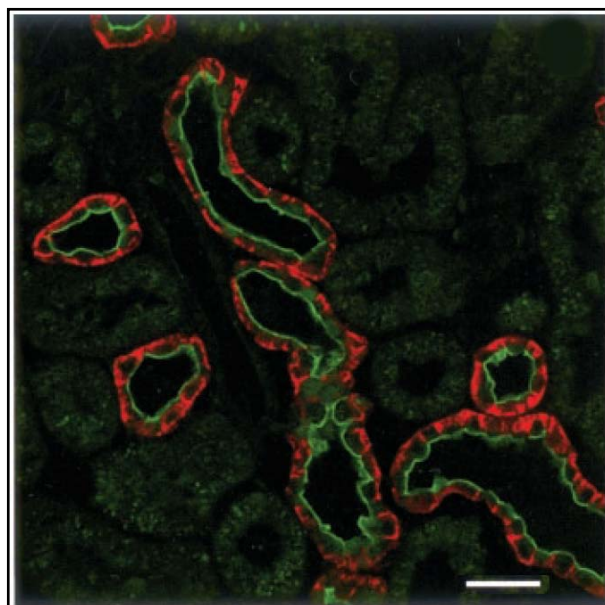


Figure 18. Co-expression de RhBG et RhCG dans des cellules épithéliales du canal collecteur de rat.

Des coupes de rein de rat ont été immunomarquées pour RhBG (rouge) et RhCG (vert). Barre d'échelle, 15 μm . D'après Quentin *et al.*, 2003.

2.3.3 - Etudes fonctionnelles des glycoprotéines Rh

Le rôle des protéines RhAG et RhCG (qui fut la première protéine homologue non érythroïde identifiée) dans le transport d'ammonium a été évalué par des tests de complémentation fonctionnelle chez *S. cerevisiae*. RhAG et RhCG, exprimées séparément dans une souche de levure déficiente pour les trois transporteurs d'ammonium Mep1, Mep2 et

Mep3, permettent une croissance normale sur milieu contenant de faibles concentrations d'ammonium comme source unique d'azote (figure 19). Par ailleurs, cette étude démontre que RhAG et RhCG confèrent à la souche déficiente une résistance à la toxicité du méthylammonium (MA) à forte concentration, probablement en permettant son export de la cellule. Ces résultats suggéraient pour la première fois que les protéines RhAG et RhCG étaient impliquées dans le transport bidirectionnel (import et export) de l'ammonium (Marini *et al.*, 2000a). D'autres expériences de complémentation dans la levure ont confirmé ces résultats et ont montré de plus que le transport bidirectionnel assuré par la protéine RhAG est dépendant du pH, suggérant une fonction d'échangeur NH_4^+/H^+ (Westhoff *et al.*, 2004).

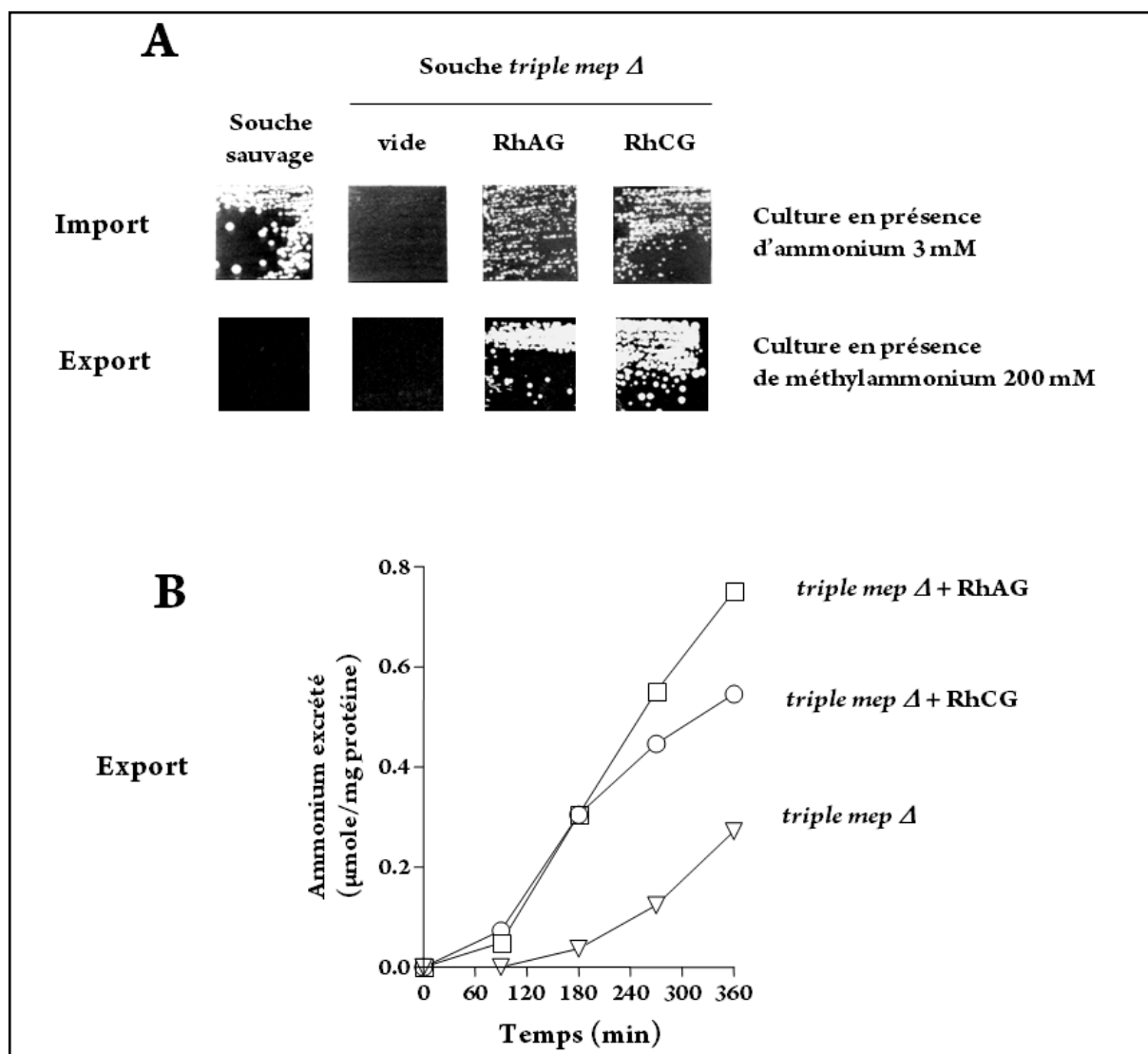


Figure 19. Complémentation fonctionnelle chez la levure.

(A) La souche *triple mepΔ* est incapable de croître sur le milieu contenant 3 mM NH_4^+ à pH 6,1, alors que la souche sauvage croît normalement. L'introduction de RhAG ou de RhCG dans cette souche restaure sa capacité de croissance. La souche sauvage et la souche *triple mepΔ* ne poussent pas dans des milieux contenant des concentrations toxiques de méthylammonium (200 mM). Cependant, la croissance est restaurée avec les souches *triple mepΔ* exprimant les protéines RhAG ou RhCG. (B) Dans des conditions de culture où l'ammonium est issu du catabolisme de l'arginine, la vitesse d'excrétion d'ammonium dans le milieu de culture est bien plus importante lorsque les cellules *triple mepΔ* expriment RhAG ou RhCG. D'après Marini *et al.*, 2000a.

Depuis, de nombreuses études ont été réalisées sur les glycoprotéines Rh pour tenter d'évaluer leur rôle potentiel dans le transport de NH_3 ou NH_4^+ en les exprimant dans différents systèmes d'expression. Les résultats de ces études diffèrent en fonction du système

d'expression utilisé et du mode de détermination de l'activité de transport de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (tableau 3), suscitant de nombreuses controverses quant à la nature du substrat utilisé.

Tableau 3. Méthodes utilisées et mécanismes de transport déduits pour les glycoprotéines Rh.

D'après Javelle *et al.*, 2007.

Protéines	Systèmes	Méthodes*	Mécanismes	Références
RhAG	Ovocyte	ET	Echange électroneutre NH_4^+/H^+	Westhoff et al. (2002)
	Levure	ET	Echange électroneutre NH_4^+/H^+	Westhoff et al. (2004)
	Ghosts de GRs	pH	Canal à NH_3	Ripoche et al. (2004)
	Cellules HeLa	pH	Transport de NH_4^+ et NH_3	Benjelloun et al. (2005)
	Ovocyte	EP/pH	Transport électroneutre de NH_3	Ludewig (2006)
	GRs	ET	Export de NH_4^+	Hemker et al. (2003)
RhBG	Ovocyte	EP/ET/pH	Echange électroneutre NH_4^+/H^+	Ludewig (2004)
	Ovocyte	EP/pH	Transport électrogénique à NH_4^+	Nakhoul et al. (2005)
	HEK293 et MDCK	pH	Canal à NH_3	Zidi-Yahiaoui et al. (2005)
	Ovocyte	EP/ET	Echange électroneutre NH_4^+/H^+	Mak et al. (2006)
RhCG	Ovocyte	EP/pH	Transport de NH_4^+ et NH_3	Bakouh et al. (2004)
	HEK293 et MDCK	pH	Canal à NH_3	Zidi-Yahiaoui et al. (2005)
	Ovocyte	EP/ET/pH	Transport électroneutre de NH_3	Mayer et al. (2006b)
	Ovocyte	EP/ET	Echange électroneutre NH_4^+/H^+	Mak et al. (2006)

* : ET, Expériences de Transport en utilisant la ^{14}C -méthylamine ; pH, mesure du pH ; EP, mesures électrophysiologiques

Une étude de transport d'ammonium par RhAG révèle que du MA extracellulaire radiomarké est transporté 8 à 10 fois plus efficacement dans le cytoplasme d'ovocytes de Xénope (Westhoff *et al.*, 2002). Ce transport est indépendant du potentiel de membrane mais est inhibé en présence de NH_4Cl . L'augmentation du pH extracellulaire et la diminution du pH intracellulaire induisent une augmentation de la capture de MA, suggérant un échange électroneutre entre NH_4^+ et H^+ . Dans ce même système d'expression, des conclusions similaires ont été trouvées pour RhBG et RhCG (Bakouh *et al.*, 2004; Ludewig, 2004; Mak *et al.*, 2006). Par des approches électrophysiologiques et en présence de NH_4Cl , il a par ailleurs été montré que lorsque RhCG était exprimée dans des ovocytes, un courant entrant dont l'amplitude est augmentée par l'hyperpolarisation de la membrane, est induit. Ceci indique que RhCG est impliquée dans le transport de NH_4^+ . Cependant, la glycoprotéine semble également jouer un rôle dans le transport de NH_3 puisque son affinité pour NH_4^+ et l'augmentation du courant entrant sont affectées par NH_3 . Ces résultats suggèrent que la protéine RhCG joue un rôle spécifique dans le transport de NH_4^+ et de NH_3 (Bakouh *et al.*, 2004). Cette hypothèse a également été établie pour RhAG exprimée dans des cellules HeLa

(Benjelloun *et al.*, 2005). Enfin, d'autres études ont montré que NH_3 était exporté par RhAG (Hemker *et al.*, 2003) ou transporté par RhAG (Ludewig, 2006) et RhCG (Mayer *et al.*, 2006b), ou que RhBG transportait uniquement NH_4^+ (Nakhoul *et al.*, 2005).

Alors qu'il était décrit que NH_3 traversait rapidement la bicouche lipidique des GRs par une diffusion passive (Labotka *et al.*, 1995), notre laboratoire a étudié le transport d'ammonium à la surface de GRs de variants Rh_{null} par la technique de spectrophotométrie en flux interrompu qui permet l'analyse des cinétiques très rapides (Ripoche *et al.*, 2004). Cette étude a révélé deux éléments importants : i) les constantes de variation du pH intracellulaire chez des ghosts de GRs (membrane de GRs ne possédant plus les constituants cytoplasmiques) RhD+ et RhD- sont identiques, démontrant que la protéine RhD n'intervient pas dans le transport de $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{NH}_2$, ii) l'étude de variants Rh_{null} démontre que le degré de réduction du niveau d'expression de RhAG est parfaitement corrélé à la diminution de la cinétique d'alcalinisation. Ainsi, ces résultats suggèrent que RhAG pourrait accélérer le passage de la forme non chargée NH_3 à travers la membrane des GRs.

Par la suite, notre laboratoire a démontré que RhBG et RhCG facilitent le transport bidirectionnel de NH_3 à travers la membrane de cellules épithéliales de rein humain transfectées : les cellules HEK293 (Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005) (figure 20).

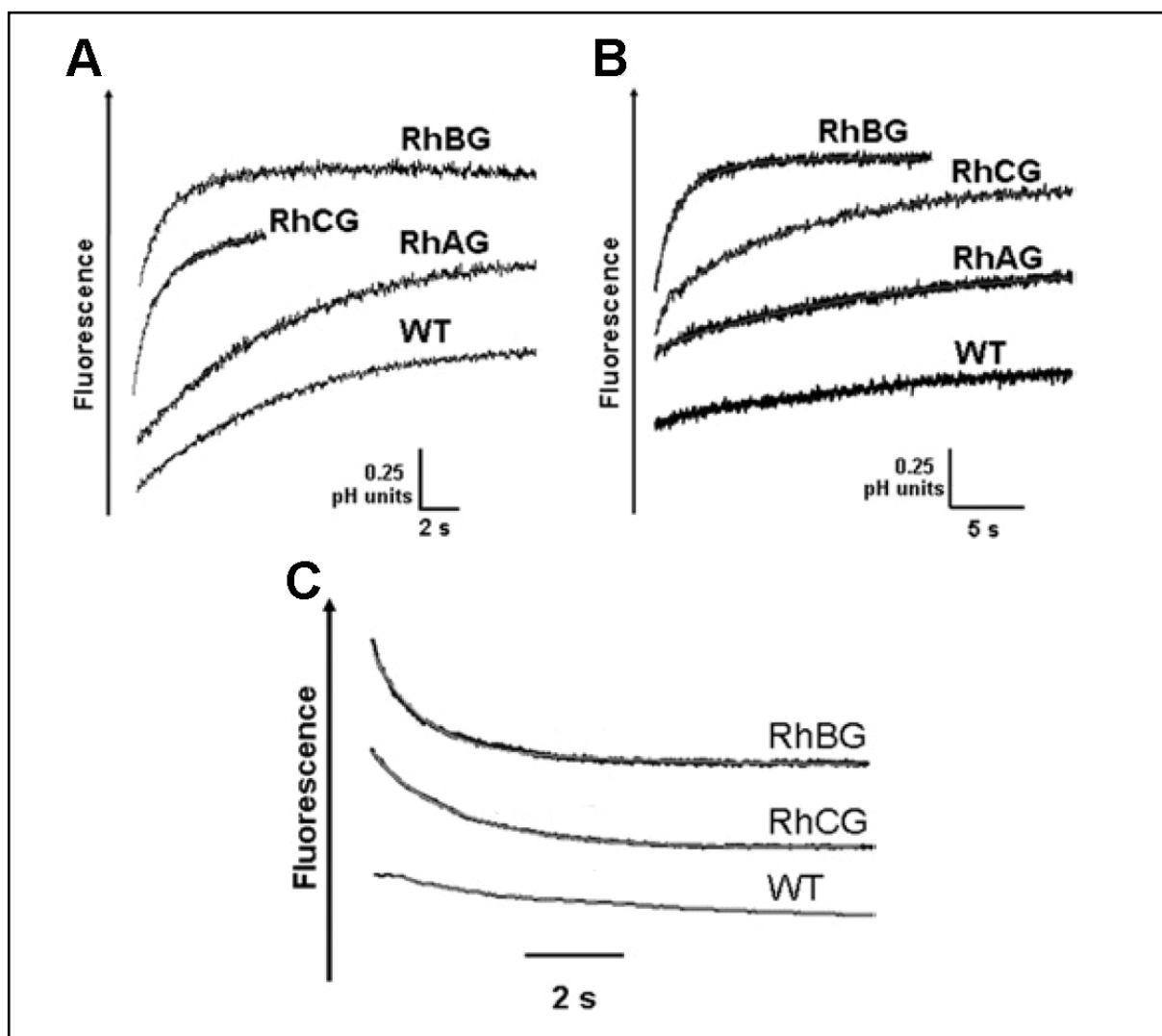


Figure 20. Cinétiques de variation de fluorescence.

Les cellules HEK293 sauvages (WT) ou exprimant RhAG, RhBG ou RhCG ont été soumises à un gradient iso-osmotique entrant de 32,5 mmoles d'ammonium (A) ou de méthylammonium (B) à 15°C. Les changements de pH_i sont corrélés aux variations de fluorescence de la sonde BCECF sensible au pH. (C) Les cellules HEK293 WT ou exprimant RhBG ou RhCG ont été soumises à un gradient sortant de 49 mmoles d'ammonium. D'après Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005.

Les résultats observés en figure 20 permettent de déterminer les constantes d'alcalinisation reflétant la vitesse du transport d'ammonium. Dans les cellules HEK293, les protéines RhBG et RhCG présentent une constante plus élevée (1 s^{-1} et $0,88 \text{ s}^{-1}$, respectivement) que celle des cellules sauvages (WT) ($0,18 \text{ s}^{-1}$). Deux mécanismes possibles en résultent : un échange NH_4^+/H^+ ou un transport facilité de NH_3 . Cependant deux arguments sont en faveur d'un transport de la forme non protonée : les cinétiques rapides de changement du pH_i visualisées en figure 20 sont en désaccord avec les cinétiques plus lentes

associées aux fonctions d'un antiport (échangeur Na^+/H^+) (Bierman *et al.*, 1987). Par ailleurs, le calcul de l'énergie d'activation (E_a) est un argument permettant de déterminer si l'entrée d'ammonium est un processus faiblement ou fortement dépendant de la température. Les énergies d'activation montrent que le transport d'ammonium est moins dépendant de la température dans les cellules exprimant RhBG et RhCG que dans les cellules WT (figure 21). La diminution significative des E_a associées aux expressions de RhBG et RhCG démontre que ces glycoprotéines sont des canaux à NH_3 plutôt que des échangeurs actifs dont la fonction nécessite un changement conformationnel dépendant du niveau d'énergie (Smith *et al.*, 1993; Labotka *et al.*, 1995).

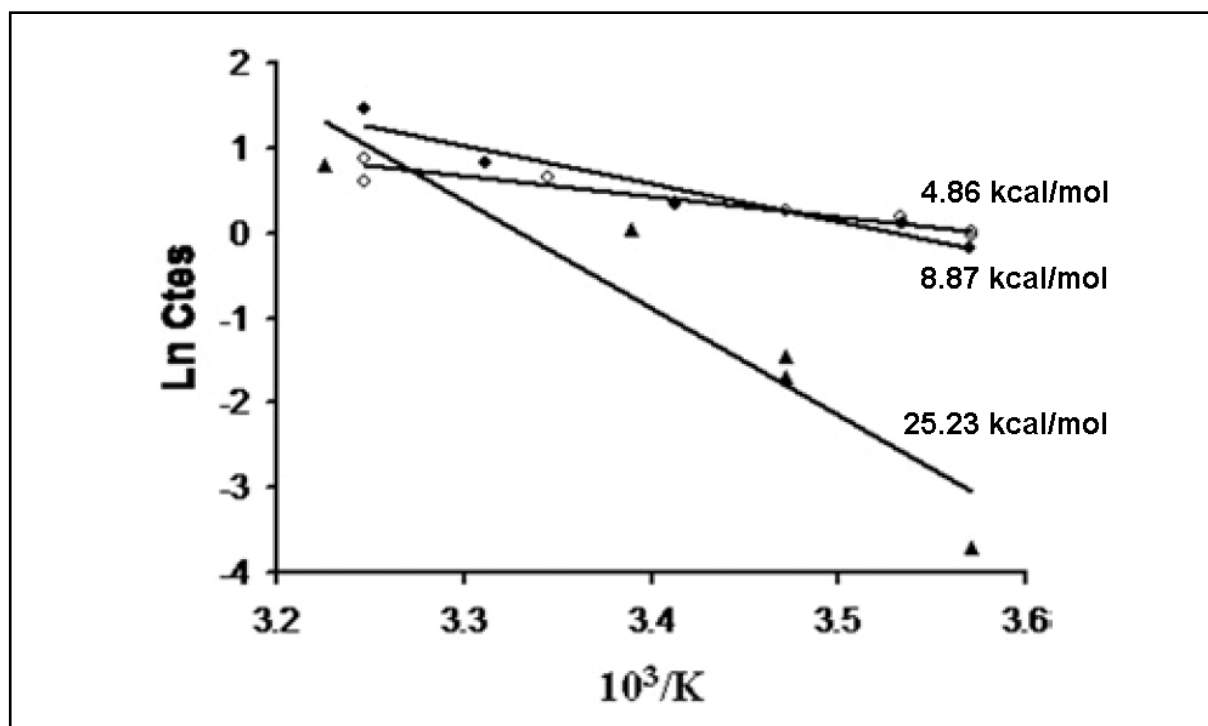


Figure 21. Droite d'Arrhenius de la perméabilité à l'ammonium dépendante de la température dans les cellules HEK293.

La dépendance de la température du transport d'ammonium a été analysée dans les cellules HEK293 WT (\blacktriangle), RhBG (\blacklozenge) et RhCG (\diamond). Les énergies d'activation (E_a) d'Arrhenius pour la perméabilité à l'ammonium sont indiquées sur les droites. D'après Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005.

Bien que l'étude précédente a montré que RhAG facilitait le transport de NH_3 à la membrane de GRs (Ripoche *et al.*, 2004), l'expression de la protéine à la surface des cellules HEK293 ne permet pas de visualiser cette fonction (figure 20). Cette absence d'activité peut s'expliquer par le fait que le nombre de copies de la protéine à la surface des cellules HEK293

est extrêmement faible (9500 copies de RhAG/cellule), nombre inférieur à celui trouvé à la surface de globules rouges Rh_{null} présentant une activité de transport fortement diminuée et utilisés lors de la première étude (17000 copies de RhAG/GR). Cette faible expression est vraisemblablement due à l'absence des partenaires de la protéine RhAG présents dans les GRs : RhD et RhCE (Cartron, 1999), l'ankyrine R (Nicolas *et al.*, 2003) et l'AE1 (Bruce *et al.*, 2003). Il semble que l'efficacité de transport soit directement liée au taux d'expression membranaire des glycoprotéines Rh. L'étude du transport dans une lignée cellulaire épithéliale de rein canin MDCK, démontre que l'activité de transport n'est pas dépendante de la lignée cellulaire, puisque les cellules MDCK exprimant RhBG transportent l'ammonium plus efficacement que des cellules WT ($0,76 \text{ s}^{-1}$ vs $0,18 \text{ s}^{-1}$) (Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005). Ainsi, les conclusions déduites des expériences de spectrophotométrie en flux interrompu sont en accord avec la résolution de la structure cristallographique et des expériences de transport qui démontrent que l'AmtB est un canal qui conduit la forme non chargée NH_3 (Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004).

Cependant, l'étude d'une protéine *Rh-like* présente dans l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, un des rares micro-organismes à exprimer une protéine Rh, montre que sa croissance est régulée par la présence de la protéine Rh1 et du CO_2 , suggérant un rôle de canal à CO_2 (Soupene *et al.*, 2002a; Soupene *et al.*, 2004). Enfin, des expériences de spectrométrie de masse réalisées dans des GRs humains montrent que : i) les protéines Rh agissent comme un canal à CO_2 , ii) le canal n'est pas sélectif pour un seul gaz, mais pourrait permettre également le passage de NH_3 , iii) la perméabilité élevée pour le CO_2 des membranes de GRs est essentiellement due aux protéines AQP-1 (aquaporine-1) et RhAG (Endeward *et al.*, 2008).

2.3.4 - Etude de la structure tridimensionnelle des glycoprotéines Rh

Des expériences de modélisation moléculaire des protéines de la famille Rh ont été réalisées à partir de la structure cristallographique de l'AmtB (Conroy *et al.*, 2005; Callebaut *et al.*, 2006). Ces études permettent de définir de possibles résidus jouant un rôle important dans le transport facilité de NH_3 . Dernièrement, la résolution de la structure cristallographique d'une protéine *Rh-like* a été décrite dans deux études (Li *et al.*, 2007; Lupo *et al.*, 2007). En

effet, *Nitrosomonas europaea* fait partie des rares micro-organismes à exprimer une protéine *Rh-like* (Chain *et al.*, 2003). Cette protéine de 50 kDa a la capacité de transporter l'ammonium (Cherif-Zahar *et al.*, 2007; Weidinger *et al.*, 2007). Le cristal montre une protéine homotrimérique (figure 22) dont la structure est peu différente de celle de l'AmtB. La nature du substrat est toujours controversée puisque la première étude décrit un canal bidirectionnel à NH_3 (Lupo *et al.*, 2007) et la seconde montre la possible présence d'une poche cytoplasmique à CO_2 qui interviendrait dans le transport du gaz par un mécanisme inconnu (Li *et al.*, 2007).

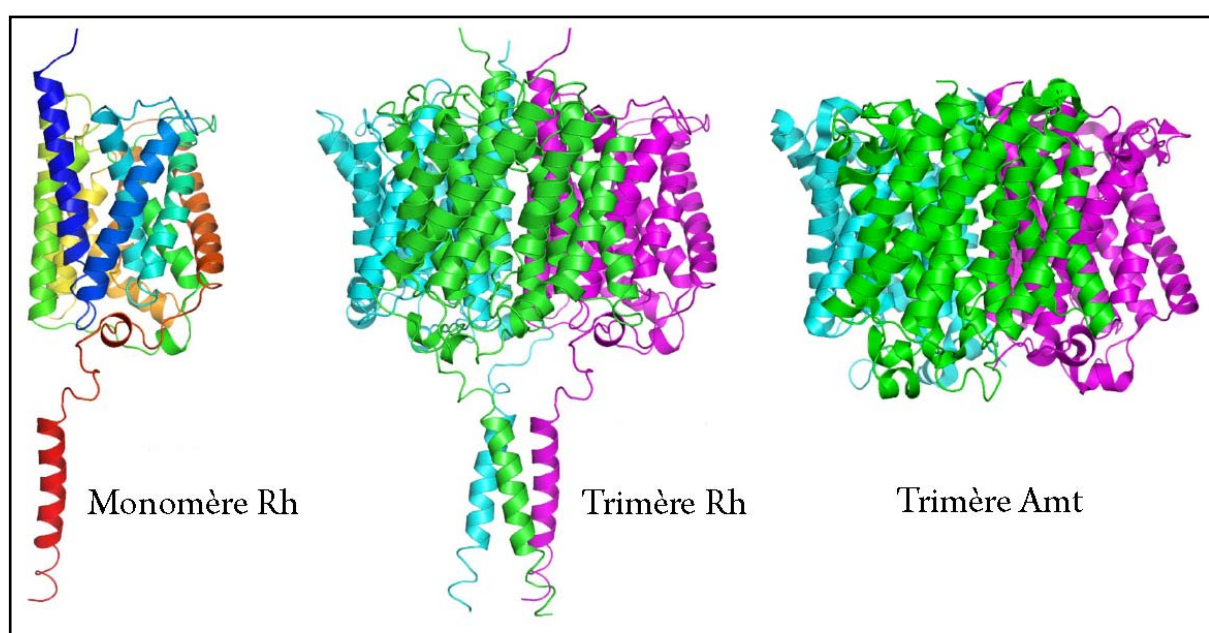


Figure 22. Structure de la protéine Rh de *N. europaea*.

À gauche, diagramme en ruban d'une sous-unité de la protéine Rh de *N. europaea* dont les domaines transmembranaires sont colorés en arc-en-ciel du bleu au rouge. Au centre, diagramme en ruban de la protéine trimérique Rh de *N. europaea* colorée par sous-unité. À droite, diagramme en ruban de l'AmtB d'*E. coli* colorée par sous-unité. D'après Li *et al.*, 2007.

En analysant les résidus prédits pour être localisés à l'interface entre les sous-unités du trimère, il a été suggéré que la formation d'un hétérotrimère (RhD/RhCE/RhAG) à la membrane érythrocytaire était peu probable (Lupo *et al.*, 2007). Cette prédiction est en contradiction avec deux observations biologiques: i) chez les individus Rh_{null} , lorsque les protéines Rh ou RhAG sont absentes, le complexe Rh n'est pas exprimé à la membrane des GRs (Le Van Kim *et al.*, 2006). Il semble difficile d'expliquer ce résultat si ces deux protéines

sont indépendantes et ne font pas partie du même assemblage moléculaire. ii) RhAG joue un rôle de chaperon moléculaire de l'ensemble du complexe Rh (Mouro-Chanteloup *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent la formation d'un hétérotrimère. Ainsi, la structure tridimensionnelle des protéines Rh et RhAG est toujours controversée puisqu'avant la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine Rh de *N. europaea*, il était suggéré que ces protéines forment un tétramère (Eyers *et al.*, 1994). Concernant RhBG et RhCG, il semblerait que leur structure soit homotrimérique (Li *et al.*, 2007; Lupo *et al.*, 2007) et la possibilité que ces glycoprotéines forment un hétérocomplexe est improbable puisque RhBG et RhCG sont localisées au pôle basolatéral et apical, respectivement, des cellules épithéliales.

2.3.5 - Rôle fonctionnel de Rhbg

Afin d'évaluer le rôle fonctionnel de la protéine Rhbg, une invalidation du gène *Rhbg* murin a été réalisée (souris *Rhbg* *-/-*) (Chambrey *et al.*, 2005). La protéine murine est plus courte que la protéine humaine (455 acides aminés pour Rhbg contre 458 pour RhBG) et l'identité de séquence protéique entre les deux protéines est de 85%. Rhbg diffère de la protéine humaine par l'absence de 3 acides aminés en N-terminal (⁸AAG¹⁰), une séquence 3' d'ARN non traduite plus courte et enfin sur l'ensemble de la séquence peptidique, des substitutions de 26 acides aminés dont la nature n'est pas conservée (Liu *et al.*, 2001) (figure 8).

Après vérification de l'absence d'expression de la protéine Rhbg dans les tissus rénaux et hépatiques des souris *Rhbg* *-/-*, des études physiologiques sur les animaux *Rhbg* *+/+* et *Rhbg* *-/-* ont été menées (Chambrey *et al.*, 2005). Dans des conditions basales, les souris *Rhbg* *-/-* ne présentent pas d'acidose métabolique rénale caractéristique d'un défaut de transport d'ammonium dans la partie distale du rein. Elles sont capables d'augmenter normalement l'excrétion de NH₄⁺ urinaire en réponse à une acidose métabolique. Les souris ne souffrent pas d'encéphalopathie hépatique, d'hyperammonémie et de diminution de la concentration en glutamine plasmatique dues à un dysfonctionnement du métabolisme de l'ammonium hépatique. L'étude du transport d'ammonium à travers la membrane de cellules du canal collecteur des souris *Rhbg* *-/-* par des expériences de microperfusion de tubules montre que l'entrée de NH₃ ou de NH₄⁺ à travers la membrane basolatérale est normale. Rhcg, localisée au

pôle apical chez les souris *Rhbg* +/+ , se retrouve au même pôle pour les souris *Rhbg* -/- . Il n'y a donc pas eu de phénomène de compensation qui aurait entraîné l'expression au pôle basolatéral de la protéine. De plus, il n'y a également pas eu de compensation par la surexpression de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolatéral AE1 et de la pompe H^+ -ATPase apicale qui aurait pu masquer l'absence de *Rhbg*. En effet, dans le canal collecteur, le transport de NH_3 est possible grâce à un gradient de H^+ généré par la sécrétion de H^+ (Knepper *et al.*, 1989) se produisant lors de l'action combinée de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolatéral AE1 et de la pompe H^+ -ATPase apicale (Stone *et al.*, 1983). Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que la protéine *Rhbg* n'est pas nécessaire à l'excrétion rénale de NH_4^+ et au recyclage hépatique du NH_4^+ plasmatique. De plus, il semble peu probable que *Rhbg* soit un transporteur de CO_2 . Lors de l'entrée du CO_2 dans les cellules intercalaires, il est hydraté par l'anhydrase carbonique pour former un H^+ et HCO_3^- , les substrats de l'AE1 et de l' H^+ -ATPase. Un défaut de transport de CO_2 aurait entraîné une diminution du nombre de H^+ excrétés dans l'urine, donc une augmentation du pH urinaire, ce qui n'a pas été détecté chez les souris *Rhbg* -/- .

La protéine *Rhcg* n'a été décrite qu'au pôle apical des cellules épithéliales dans les souris *Rhbg* +/+ et *Rhbg* -/- (Chambrey *et al.*, 2005). Il en est de même, pour la protéine RhCG humaine, dans une lignée de cellules épithéliales polarisées (données non publiées). Il a été montré qu'elle était également localisée au pôle basolatéral de cellules épithéliales rénales humaines (Han *et al.*, 2006) et de rats (Seshadri *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Ainsi, la possibilité que dans les souris *Rhbg* -/- la protéine *Rhcg* soit présente à la membrane basolatérale des cellules épithéliales rénales existe. Cette localisation n'a pas été visualisée mais pourrait compenser l'absence de *Rhbg*. Par ailleurs, la présence d'aquaporines à la membrane basolatérale des cellules épithéliales du néphron distal est intéressante. Les aquaporines (AQP) sont des protéines membranaires qui transportent l'eau à travers un canal (King *et al.*, 2004). On connaît l'existence de onze AQPs à l'heure actuelle, elles présentent une structure tétramérique. AQP3 et AQP4 sont présentes à la membrane basolatérale de cellules principales du néphron distal, alors que AQP8 et AQP9 sont exprimées à la membrane plasmique de cellules hépatiques (King *et al.*, 2004). Des études ont montré que lorsque AQP3, AQP8 et AQP9 étaient exprimées séparément dans des ovocytes de Xénope, elles

avaient la capacité de transporter l'ammonium (Holm *et al.*, 2005). De plus, par des expériences de complémentation fonctionnelle dans *S. cerevisiae*, l'AQP8 restaure la croissance d'une souche *triple mepΔ* (Jahn *et al.*, 2004). Par des approches électrophysiologiques, l'AQP8 purifiée et reconstituée dans une bicouche lipidique plane, transporte de préférence NH_3 par rapport à l'eau (Saparov *et al.*, 2007), mais l'absence d'effet physiologique pour le transport de NH_3 dans une souris invalidée pour le gène *Aqp8* suggère que la protéine AQP8 n'est pas impliquée dans le transport de l'ammonium (Yang *et al.*, 2006). Cependant, il est possible que certaines AQPs puissent compenser le transport d'ammonium des souris *Rhbg* $-/-$.

D'autres fonctions possibles des glycoprotéines Rh restent à évaluer. La possibilité que les protéines Mep2 et AmtB puissent être des transporteurs et senseurs de NH_4^+ (Javelle *et al.*, 2004; Van Nuland *et al.*, 2006) laisse suggérer que les glycoprotéines Rh agissent également comme des senseurs. La découverte dans un modèle de glioblastome murin de la présence des gènes *Rhbg* et *Rhcg* comme gènes candidats pouvant induire un cancer (Johansson *et al.*, 2004) suggère que les protéines Rh glycosylées pourraient être également impliquées dans la prolifération. Enfin, Rh/RhAG/AE1/ankyrine R sont supposées former un macrocomplexe à la membrane des GRs (Bruce *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2003). Par homologie, nous soupçonnons l'existence d'un macrocomplexe RhBG/AE1/ankyrine G à la membrane des cellules épithéliales rénales (Nicolas *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2006). On peut ainsi supposer que RhBG puisse intervenir dans la régulation de l'activité de l'AE1 et inversement.

3 – Régulation de l'expression membranaire de RhBG

Lors de la mise en évidence des résidus localisés dans les extrémités C-terminales des protéines Rh et RhAG, indispensables à l'interaction entre ces protéines et l'ankyrine R, trois acides aminés ont été découverts naturellement mutés, soit dans la protéine RhAG de patients Rh_{null}, soit dans la protéine Rh de variants D-faible (Cartron, 1999; Wagner *et al.*, 1999). Cette découverte suggérait un rôle crucial de l'interaction entre Rh, RhAG et l'ankyrine R pour la biosynthèse et/ou la stabilité du complexe Rh à la membrane des GRs (Nicolas *et al.*, 2006).

En considérant ces résultats et le fait que l'ankyrine G a été observée au pôle basolatéral de cellules épithéliales tubulaires de rein (Peters *et al.*, 1995; Piepenhagen *et al.*, 1995), notre laboratoire a émis l'hypothèse que RhBG puisse s'associer au squelette dépendant de la spectrine via des homologues non érythroïdes de l'ankyrine R, l'ankyrine B ou l'ankyrine G (Lopez *et al.*, 2005). Les domaines cytosoliques de protéines membranaires sont connus pour être impliqués dans leur adressage (Mellman, 1996; Bonifacino and Dell'Angelica, 1999) et pour certaines molécules d'adhérence et transporteurs d'ions, leur ancrage, via les ankyrines, au squelette sous-membranaire dépendant de la spectrine (Bennett and Baines, 2001; Mohler *et al.*, 2005). Par des expériences de double hybride dans la levure, il a ainsi été montré que l'extrémité C-terminale de RhBG (RhBG-Cter) pouvait interagir spécifiquement avec les sous-domaines D3 et D4 du domaine de liaison à la membrane de l'ankyrine G et le sous-domaine D3 de l'ankyrine B (Lopez *et al.*, 2005). La relevance biologique de l'interaction avec les ankyrines B et G a été étudiée *in vivo* par des expériences d'immunocolocalisation sur des coupes rénales de rat. RhBG et l'ankyrine G sont colocalisées dans les cellules du canal collecteur alors que l'ankyrine B n'est pas exprimée dans ces cellules. Ainsi, RhBG pourrait être associée au squelette dépendant de la spectrine de cellules épithéliales rénales via l'ankyrine G. Le motif ⁴¹⁹FLD⁴²¹ a été identifié comme le site responsable de l'interaction entre RhBG-Cter et l'ankyrine G (figure 23).

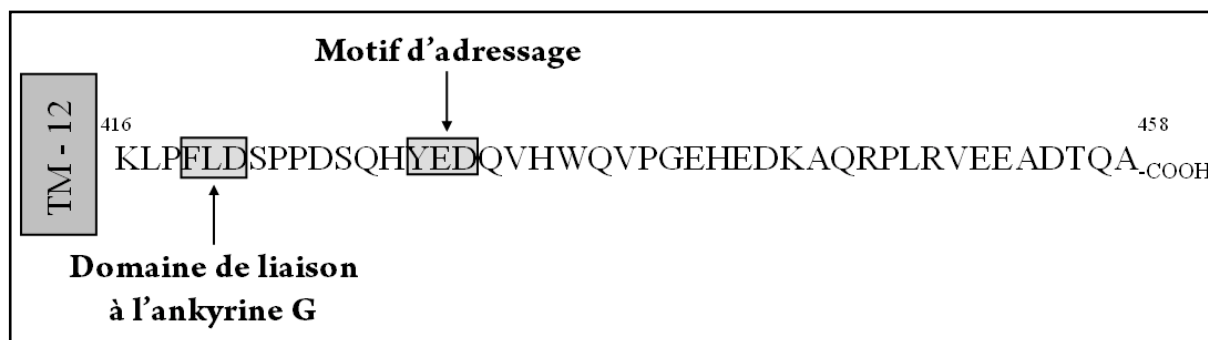


Figure 23. Séquence protéique de l'extrémité C-terminale du RhBG humain (RhBG-Cter).

TM-12 représente la structure polytopique de RhBG avec les 12 domaines transmembranaires en amont de l'extrémité C-terminale.

Dans le but d'étudier l'adressage basolatéral de RhBG, la protéine a été exprimée dans des cellules MDCK. Lorsque ces cellules sont polarisées, RhBG est correctement adressée (Lopez *et al.*, 2005) (figure 24). Le motif responsable de l'adressage basolatéral a été déterminé : il s'agit du site ⁴²⁹YED⁴³¹ localisé dans RhBG-Cter (figure 23). En effet, le triple mutant alanine de ce site dépolarise l'expression de RhBG dans des cellules MDCK polarisées (figure 24). Ce motif dévie de la séquence standard des signaux dépendant d'une tyrosine YXX ϕ (Y est une tyrosine, X est un acide aminé et ϕ est un acide aminé présentant un groupement hydrophobe volumineux) responsables de l'adressage à la membrane basolatérale de cellules polarisées, ainsi que vers les lysosomes et autres organelles (Canfield *et al.*, 1991; Mellman, 1996). En effet, RhBG-Cter possède une glutamine (Q) au lieu d'un acide aminé hydrophobe en Y+3 (figure 23), qui n'intervient pas dans l'expression polarisée de RhBG (figure 24).

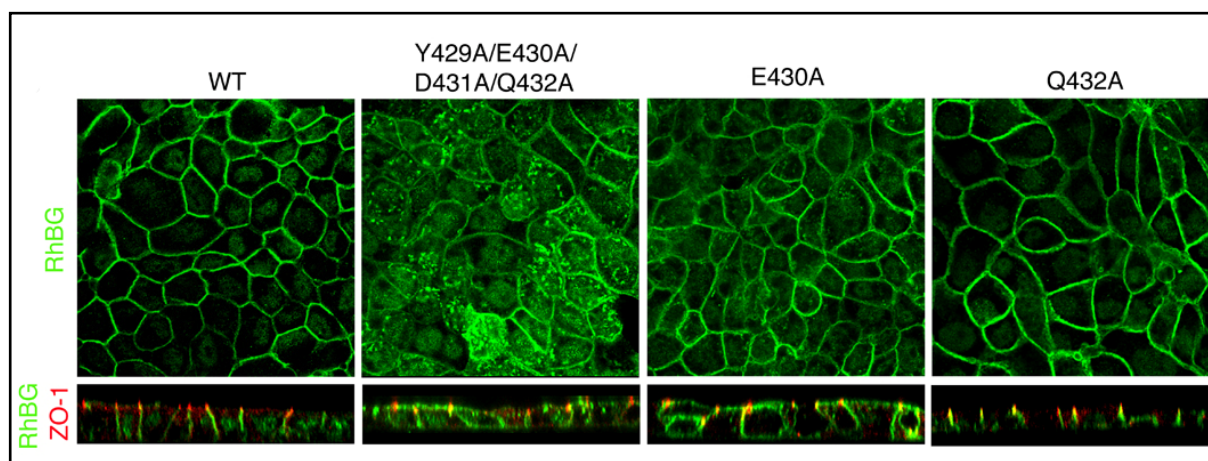


Figure 24. Détermination du signal d'adressage basolatéral de RhBG.

Analyse par microscopie confocale de l'expression de protéines RhBG recombinantes dans des cellules MDCK. Les clones de MDCK exprimant la protéine sauvage (WT) ou mutée ont été cultivés 7 jours sur filtre Transwell puis traités pour la microscopie à immunofluorescence indirecte. Les cellules ont été fixées et perméabilisées avant l'ajout des anticorps polyclonaux anti-RhBG-Cter et monoclonaux anti-ZO-1 puis des anticorps secondaires fluorescents. ZO-1 (zonula occludens) est un marqueur des jonctions serrées qui délimite les domaines apicaux et basolatéraux. *Panneaux du haut*, sections horizontales XY montrant RhBG marqué dans les clones WT et mutants. *Panneaux du bas*, sections verticales XZ (vue de côté) montrant RhBG (vert) et ZO-1 (rouge). Y429A et D431A présentent le même profil d'expression que le mutant E430A (les images ne sont pas montrées). Le mutant Q432A n'a aucun effet sur l'expression. Il n'est donc pas considéré comme faisant partie du motif d'adressage. D'après Lopez *et al.*, 2005.

Enfin, l'influence de l'accrochage de RhBG à l'ankyrine G sur son expression membranaire a été mise en évidence en réalisant un triple mutant alanine du motif ⁴¹⁹FLD⁴²¹ et en exprimant la protéine mutée dans des cellules MDCK polarisées. Dans ces conditions, RhBG mutée n'est plus exprimée à la membrane, mais est retenue dans le cytoplasme (figure 25). Ce résultat montre définitivement que l'interaction avec l'ankyrine G est indispensable à l'expression de RhBG à la surface de cellules épithéliales polarisées.

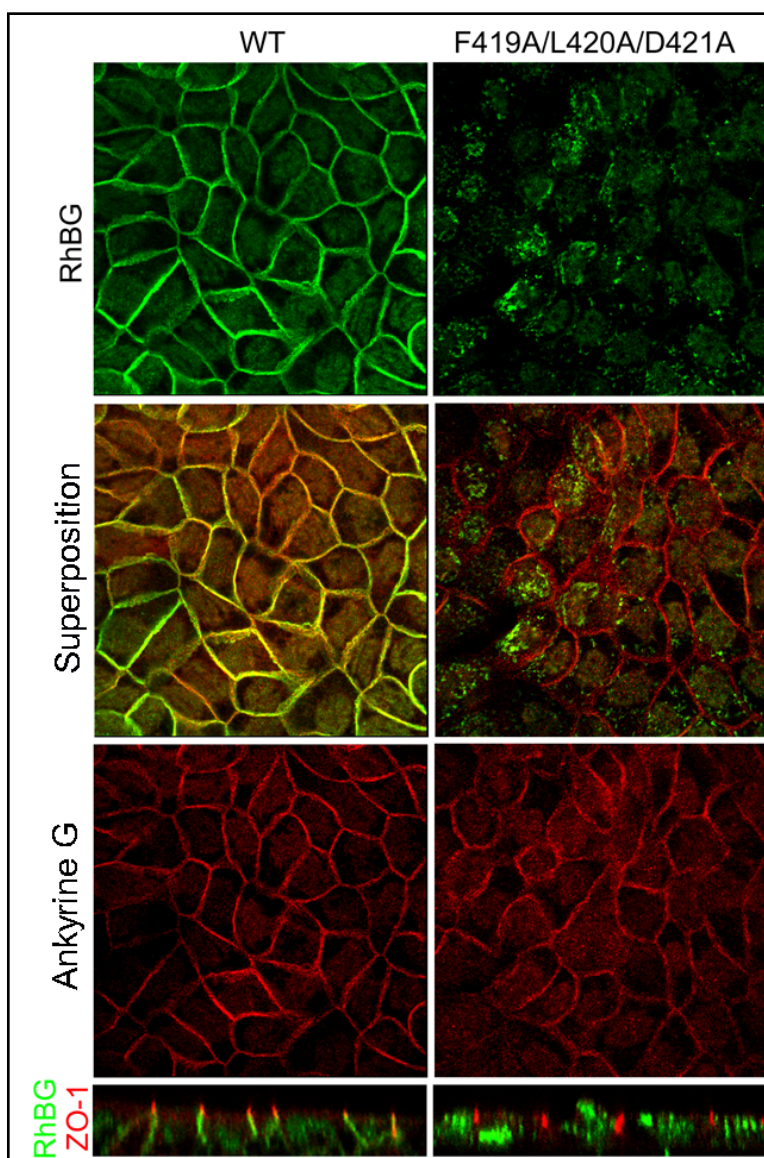


Figure 25. Effet de la mutation du site de liaison à l'ankyrine G sur l'expression à la surface de RhBG.

Les cellules MDCK exprimant RhBG WT ou muté sur le site d'accrochage à l'ankyrine ont été cultivées et traitées comme indiqué dans la figure 24. Les panneaux du haut et du bas représentent respectivement les marquages RhBG (vert) et ankyrine G (rouge) de cellules exprimant RhBG sauvage (WT, à gauche) ou la protéine RhBG mutée (F419A/L420A/D421A, à droite). Les panneaux centraux montrent la superposition des signaux d'immunofluorescence de RhBG et de l'ankyrine G. Comme attendu, RhBG WT et l'ankyrine G endogène présentent une expression basolatérale. D'après Lopez et al., 2005.

OBJECTIFS

La glycoprotéine RhBG est exprimée à la membrane basolatérale de cellules épithéliales localisées dans des sites importants pour le transport d'ammonium. La localisation basolatérale de RhBG est médiée par deux motifs : i) un signal dépendant d'une tyrosine localisé dans son extrémité C-terminale intracytoplasmique (Cter), responsable de l'adressage de RhBG, ii) un site de fixation à l'ankyrine G, protéine adaptatrice du squelette dépendant de la spectrine, localisé également dans son Cter, indispensable à l'expression membranaire et à l'ancrage de la protéine à la surface des cellules polarisées.

Bien que la structure de l'extrémité C-terminale de l'AmtB et des glycoprotéines Rh n'ait pas été résolue, ce domaine ne semble pas être un élément indispensable au canal à NH₃. Cependant, plusieurs études mutationnelles sur les Amts de champignons (Marini *et al.*, 1997b; Marini *et al.*, 2000a; Monahan *et al.*, 2002b; Biswas and Morschhauser, 2005) et de plantes (Ludewig *et al.*, 2003) ont mis en évidence l'importance du Cter pour la fonction de transport. De plus, la récente structure de l'homologue Rh de *N. europaea* révèle la présence d'une hélice C-terminale qui pourrait réguler l'ouverture du canal via une interaction avec un partenaire protéique (Li *et al.*, 2007). La structure cristallographique de l'Amt-1 d'*A. fulgidus* suggère que son Cter interagit physiquement avec la boucle intracytoplasmique de la protéine (Andrade *et al.*, 2005). Enfin, les études récentes sur l'AtAMT1;1 (Loque *et al.*, 2007) et l'AtAMT1;2 (Neuhauser *et al.*, 2007) proposent que la phosphorylation de sites conservés dans le Cter contrôle l'interaction de la protéine avec les sous-unités voisines et ainsi sa fonction de transport.

Le Cter de la protéine RhBG humaine contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation, les sérines S422 et S426, la tyrosine Y429 et la thréonine T456, déterminés *in silico* par l'utilisation de programmes de prédiction (figure 26). De plus, les 4 résidus à l'extrémité C-terminale (DTQA) parmi lesquels la thréonine T456 est incluse, ressemble à un domaine typique de liaison-PDZ de type I (X-S/T-X-φ) connu pour réguler l'expression polarisée de nombreuses protéines membranaires dans les neurones et les cellules épithéliales

(Songyang *et al.*, 1997; Sheng and Sala, 2001), mais aussi pour moduler la fonction de canaux ioniques et récepteurs (Hall *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Raghuram *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2003).

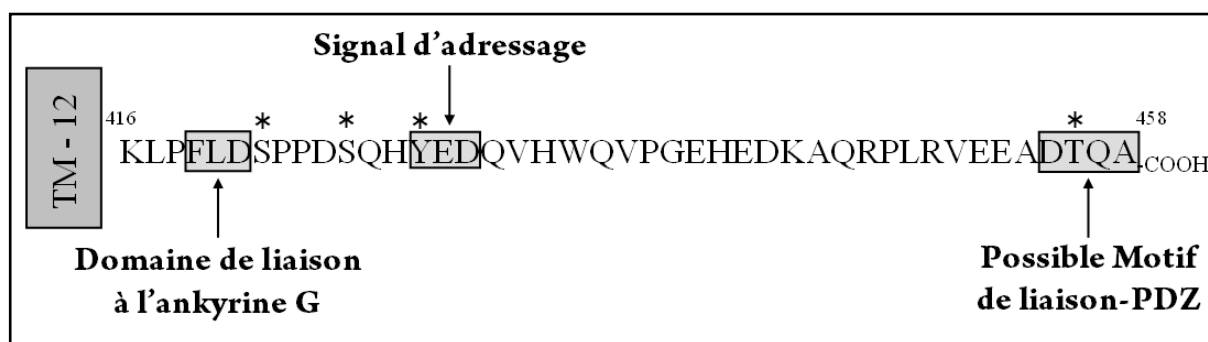


Figure 26. Séquence protéique du RhBG-Cter humain.

La séquence terminale DTQA représente un possible motif de liaison-PDZ de type I. Les sites potentiels de phosphorylation sont annotés par un astérisque.

Les objectifs de ma thèse ont donc été :

- de mettre en évidence un ou plusieurs site(s) de phosphorylation.
- d'étudier le rôle de cette(ces) phosphorylation(s) sur l'activité de transport de RhBG mais également sur son adressage et son ancrage à la membrane basolatérale de cellules épithéliales polarisées.
- de définir le rôle de l'ancrage au squelette dépendant de la spectrine sur la fonction de transport d'ammonium.
- de proposer un modèle de régulation de l'adressage et de la fonction de RhBG par son extrémité C-terminale.

MATERIELS ET METHODES

1 - Matériels

1.1 - Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification du RhBG-Cter et lors des mutagénèses ont été fournis par MWG Biotech.

1.2 - Vecteurs plasmidiques

Le vecteur pcDNA3 (Invitrogen) permet l'expression de protéines recombinantes dans une large gamme de lignées cellulaires humaines ou animales sous contrôle du promoteur CMV. Il comprend un gène de résistance à la généticine (néomycine) pour sélectionner les cellules transfectées et un gène de résistance à l'ampicilline pour l'amplification du vecteur dans les bactéries. Le vecteur pCEP₄ (Invitrogen) est similaire au vecteur pcDNA3 à l'exception de son gène de résistance à l'hygromycine pour la sélection des cellules transfectées.

Le vecteur pGEX-5X-3 (Amersham Biosciences) qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline, permet l'expression procaryote d'une séquence protéique d'intérêt fusionnée avec la protéine GST sous contrôle du promoteur *tac* inductible par l'IPTG.

1.3 - Anticorps

1.3.1 – Anticorps

L'anticorps anti-RhBG polyclonal de lapin est dirigé contre un peptide synthétique (Neosystem) correspondant aux 15 acides aminés terminaux de l'extrémité C-terminale intracytoplasmique de la protéine RhBG humaine et a été préalablement décrit (Quentin *et al.*, 2003). Il est utilisé non purifié pour la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence. Pour les expériences d'immunoblot et d'immunoprécipitation, la fraction d'immunoglobuline G (IgG) de l'anticorps anti-RhBG-Cter a été préalablement purifiée par chromatographie d'affinité (kit Sulfolink, Pierce). Les anticorps murins anti-ankyrine G humaine et anti-ZO-1 humain sont fournis par Zymed Laboratories Inc.. Les anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine P-Tyr-100 et P-Tyr-102 sont fournis par Cell Signaling Technology et l'anticorps 4G10 par Upstate. Enfin, les anticorps polyclonaux de lapin anti-Erk1+Erk2 sont fournis par Abcam. Pour les expériences de western-blots, les anticorps secondaires sont spécifiques des IgG de lapin ou de souris, conjugués à la peroxydase (P.A.R.I.S.) et sensibles aux réactifs ECL (Amersham Biosciences). Pour la microscopie à fluorescence, ce sont des Alexa Fluor 488 ou 568 de chèvre anti-IgG murines ou anti-IgG de lapin (Molecular Probes). Pour la cytométrie en flux, les anticorps secondaires sont des anti-IgG de lapin ou de souris couplés à la phycoérythrine (PE, Beckman Coulter).

1.3.2 – Production d'un anticorps murin anti-RhBG

Un anticorps polyclonal de souris dirigé contre les boucles extracellulaires de RhBG a été produit par immunisation avec des cellules mIMCD-3 recombinantes exprimant la protéine RhBG humaine à leur surface. Le programme d'immunisation (Kernov) était le suivant : des souris Balb/C SSC ont été immunisées par trois injections intrapéritonéales de 2.10^6 cellules, la première injection étant additionnée d'adjuvant complet de Freund, les injections suivantes d'adjuvant incomplet de Freund. La spécificité de reconnaissance des anticorps présents dans les ascites pour les boucles extracytoplasmiques de RhBG a été vérifiée par test ELISA, par cytométrie en flux sur des cellules HEK293 sauvages ou exprimant RhBG

(tableau 4, résultats), par immunofluorescence (figure 29, résultats) et lors d'immunoprécipitations (figure 43, résultats). Ainsi, l'ascite A-08 a été sélectionnée pour nos futures expériences.

1.3.3 – Production d'un anticorps anti-phosphopeptide de lapin

Afin d'étudier la phosphorylation *ex vivo* de la tyrosine 429 de RhBG, des anticorps de lapin ont été produits (21st Century) par immunisation avec des phosphopeptides dont les séquences sont les suivantes :

PP1 : Acetyl-QH(pY)EDQVHWQ-Ahx-C-amide

PP2 : Acetyl-C-Ahx-SPPDSQH(pY)EDQV-amide

Ahx, correspondant à 6 carbones, permet d'espacer le peptide immunogène du porteur.

Deux phosphopeptides ont été utilisés car la présence, en amont de la tyrosine, de sérines potentiellement phosphorylables oblige l'incorporation de ces résidus dans la séquence d'un des peptides, dans le cas où une(des) sérine(s) serait(seraient) effectivement phosphorylée(s).

Les phospho- (PP1 et PP2) et non-phosphopeptides (NPP1 et NPP2) ont été au préalable synthétisés, puis purifiés à environ 90% et 85%, respectivement, par HPLC et les séquences ont été vérifiées par spectrométrie de masse.

Un mélange des deux peptides a été injecté à 5 reprises chez deux lapins. Durant l'immunisation, les sérums ont été prélevés 6 fois. Un aliquot des derniers prélèvements a été immunodéplété par chromatographie d'affinité en utilisant les non-phosphopeptides. L'éluat a alors été purifié sur colonne d'affinité sur laquelle étaient fixés les phosphopeptides. Les anti-phosphopeptides ont été élués par l'utilisation de phényl-phosphate. La spécificité de reconnaissance des sérums et anticorps purifiés pour les phosphopeptides a été réalisée par dot-blots en utilisant des membranes PVDF (Millipore) dont la taille des pores est de 0,45 µm. Les peptides lyophilisés PP1, PP2 et NPP2 étant chargés négativement, ils ont été

solubilisés dans de l'eau. Le peptide NPP1 étant neutre, il a été solubilisé dans un mélange Trifluoroacétate/Acétonitrile 50% (vol/vol).

2 – Biologie Moléculaire

2.1 - Clonage moléculaire

Les étapes de la construction du vecteur pGEX-5X-3-RhBG-Cter sont les suivantes : L'ADNc codant l'extrémité C-terminale de RhBG (RhBG-Cter, acides aminés 416-458 à partir du codon initiateur ATG) a été amplifié par PCR à partir du vecteur pcDNA3-RhBG (Lopez *et al.*, 2005) en utilisant les primers sens : 5'-GGAATTCCAAGCTACCCTTTCTGGA-CTCCCC_{3'}, et antisens : 5'-CCGCTCGAGTTAGGCCTGAGTGTCTG_{3'} contenant respectivement les sites *EcoRI* et *XhoI* à leur extrémité 5'. Cette amplification a été réalisée en présence de 100 ng du vecteur pcDNA3-RhBG, de 250 ng de chaque primer et de 2,5 unités de DNA Taq polymérase *Pfu Turbo* (Stratagene). Les conditions de PCR ont été de 95°C pendant 2 min, 30 cycles d'amplification : 95°C/30 sec, 62°C/30 sec et 72°C/30 sec, enfin la dernière étape a duré 7 min à 72°C.

- Le vecteur pGEX-5X-3 natif ainsi que le fragment amplifié RhBG-Cter ont été digérés par les enzymes *EcoRI* et *XhoI* puis ligaturés selon un rapport moléculaire vecteur/insert de 1/6 en présence de T4 DNA ligase.

- Après transformation de bactéries ultra-compétentes *E. coli* XL10 Gold (Stratagene) par le produit de ligation, l'ADN plasmidique a été extrait et séquencé.

2.2 - Séquençage

Le séquençage est réalisé selon le principe de Sanger suivant le protocole du kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). La réaction de séquençage est effectuée en présence des 4 didéoxynucléotides, de la DNA polymérase AmpliTaq, 3,2 pmoles de l'amorce adéquate, 1 µg de l'ADN à séquencer. Les

conditions de la réaction de séquençage sont 96°C/1 min, 30 cycles (96°C/10 sec, 50°C/5 sec, 60°C/4 min). Après précipitation alcoolique à 60% (vol/vol), l'ADN est analysé par le séquenceur automatique (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

2.3 - Mutagenèse dirigée

Les mutations de l'ADNc codant la protéine RhBG sont réalisées en présence de 2,5 unités de DNA Taq polymérase *Pfu Turbo* (kit Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis, Stratagene), 25 ng d'ADN plasmidique (pGEX-5X-3-RhBG-Cter ou pcDNA3-RhBG) et 125 ng d'oligonucléotides sens et antisens.

Les conditions de la PCR sont les suivantes : 95°C pendant 2 min, 18 cycles d'amplification : 95°C/50 sec, 60°C/50 sec et 68°C/1 min/kb d'ADN plasmidique, la dernière étape se faisant à 68°C pendant 7 min. Le produit d'amplification est traité par l'endonucléase *Dpn I* spécifique de la séquence méthylée GATC dans le but de digérer l'ADN parental issu d'*E. coli*. Après transformation de bactéries XL10-Gold, l'ADN est extrait et séquencé.

2.4 - Production de protéine de fusion GST-Cter

2.4.1 – Souches de bactéries *E. coli* BL21 et TKB1

Les bactéries compétentes *E. coli* BL21 et TKB1 (Stratagene) sont transformées par le plasmide pGEX-5X-3 natif ou contenant l'ADNc RhBG-Cter, extrait des bactéries XL10-Gold. Les bactéries BL21 et TKB1 permettent l'expression en grande quantité de la protéine GST seule ou fusionnée (GST-Cter). La souche TKB1 contient également un plasmide inducible par l'IPTG codant une tyrosine kinase elk de large spécificité.

2.4.2 – Conditions de culture des bactéries BL21

Un litre de milieu 2YT supplémenté en ampicilline (100 µg/ml) et glucose 2% (m/vol) estensemencé par une préculture de bactéries BL21 transformées présentant une DO₆₀₀

initiale de 0,05 et est incubé à 37°C sous agitation. Lorsque la DO₆₀₀ atteint une valeur de 1 à 1,2, un choc thermique d'une durée de 30 min à 4°C dans la glace est réalisé. La production de protéine de fusion est induite par l'ajout d'IPTG (IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside) 0,2 mM à 37°C. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 2,5 (pH supérieur à 5,5), les bactéries sont récupérées par centrifugation.

2.4.3 – Conditions de culture des bactéries TKB1

Les bactéries TKB1 transformées sont cultivées en milieu LBA (LB+100 µg/ml Ampicilline) 6h à 37°C. Cette préculture diluée 10⁵ fois est utilisée pour ensemercer 1 mL de milieu LB. 10 µL de cette dilution sont inoculés dans 100 mL de TBA (TB+100 µg/ml Ampicilline). Enfin, 5 mL de cette dernière dilution sont ajoutés à 500 mL de TBA. Les cultures de 100 et 500 mL sont incubées sous agitation la nuit à 37°C. La DO₆₀₀ des 500 mL est ensuite mesurée. Si celle-ci est trop faible, le milieu est enrichi par l'ajout de 50 mL issus de la culture de 100 mL. 300 mL de milieu frais TBA sont alors ajoutés aux 500 mL de culture qui est réincubée à 37°C. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 2, l'IPTG est ajouté à une concentration finale de 1 mM. La production des protéines de fusion est induite pendant 2 à 4 heures à 37°C (pH supérieur à 5,5). Les bactéries sont finalement récupérées par centrifugation.

2.4.4 – Purification des protéines de fusion GST

Le culot bactérien (BL21 ou TKB1) est repris dans 30 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline : NaCl 0,15 M, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4) froid et d'inhibiteurs de protéases (IP) (une pastille "Complete EDTA free" de Roche dans 50 mL de PBS) puis lysé par sonication afin d'extraire les protéines produites. Le lysat bactérien est ensuite incubé à 4°C sur une roue en présence de PBS-Triton X-100 1% (vol/vol). Il est ensuite centrifugé et le surnageant est incubé pendant 2h avec 1 mL de billes glutathion-Sépharose-4B (Amersham Biosciences) à 4°C sous agitation. Ceci permet la fixation des protéines GST sur les billes qui sont ensuite conservées à 4°C en tampon PBS supplémenté en IP. Les protéines de fusion sont éluées à partir de 50 µL de billes, par 500 µL de tampon glutathion 20 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, durant 1h à 4°C. La concentration des protéines éluées des billes est déterminée par

mesure d'absorbance à 280 nm sachant qu'une unité de densité optique à 280 nm correspond à 0,64 mg/mL de protéines GST. Les protéines éluées sont ensuite séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% (système NOVEX, en tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glycine 192 mM, SDS 0,1%) puis colorées en bleu de Coomassie.

3 – Biologie cellulaire

3.1 - Lignées et culture cellulaires

Les lignées de cellules épithéliales rénales humaines HEK293 (Human Epithelial Kidney), de cellules épithéliales rénales de chien MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), les cellules du canal collecteur de la médulla interne de reins de souris mIMCD-3 (murine Inner Medullary Collecting Duct) et les cellules épithéliales de rein de porc LLC-PK1 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). Ces cellules adhérentes sont cultivées à 37% sous 5% CO₂. Les cellules HEK293 et mIMCD-3 sont cultivées en milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Glutamax I (Invitrogen), alors que les cellules MDCK et LLC-PK1 le sont en milieu Dulbecco's Modified Eagle's (Invitrogen) supplémenté en acides aminés non essentiels. Les milieux sont supplémentés par 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% (vol/vol) d'antibiotiques-antimycotiques 100X (pénicilline 10000 unités/mL, streptomycine 10 mg/mL, amphotéricine B 25 µg/mL, Invitrogen). À confluence, les cellules sont lavées par du PBS, puis décollées par action de la trypsine-EDTA (Invitrogen). Du versène (Invitrogen) a été ajouté au préalable uniquement pour les cellules MDCK et LLC-PK1. Elles sont ensuite diluées et remises en culture. Le milieu de culture est changé tous les trois ou quatre jours.

3.2 - Transfections

Les 4 lignées en culture présentant 30 à 50% de confluence en boîte de Pétri de 100 mm de diamètre, sont mises en présence de 4 mL d'OPTIMEM (Invitrogen), 6 µg d'ADN

plasmidique (pcDNA3-RhBG ; pCEP4-RhBG pour les cellules mIMCD-3) et 15 µg de Lipofectine (Invitrogen) à 37°C, 5% CO₂ pendant 6h, puis 4 mL de milieu de culture sont ajoutés avant de les incuber sur la nuit. Le mélange est remplacé par 10 mL de milieu de culture pendant 24h à 37°C. Les cellules sont alors trypsinées, et pour la sélection des transfectants, elles sont remises en culture en milieu supplémenté de généticine (Invitrogen) à 600 µg/mL (MDCK), 800 µg/mL (HEK293), 1,8 mg/mL (LLC-PK1) ou 400 µg/mL d'hygromycine (Invitrogen) (mIMCD-3).

3.3 - Cytométrie en flux

L'expression de la protéine RhBG recombinante dans les cellules est révélée de deux façons :

- par une technique de marquage indirect après perméabilisation des membranes à l'éthanol 60% (vol/vol) en PBS pendant 15 min dans la glace. Cette perméabilisation est indispensable lors de l'utilisation de l'anticorps anti-RhBG-Cter car l'épitope reconnu par celui-ci est situé dans l'extrémité C-terminale intracytoplasmique de la protéine. Les cellules sont incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps anti-RhBG-Cter de lapin dilué au 1/500^e en PBS contenant 1% (m/vol) de sérum albumine bovine (SAB), puis lavées deux fois en PBS par centrifugation, 10 min à 1800 trs/min. Le sérum pré-immun de souris est utilisé comme contrôle négatif. Les cellules sont ensuite incubées 30 min à température ambiante avec l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à PE dilué au 1/40^e en PBS/SAB 1%. Après un lavage final, les cellules sont resuspendues dans 500 µL de PBS/SAB 1%. L'analyse est ensuite réalisée par cytométrie en flux (FACScalibur, Becton-Dickinson).

- par un marquage indirect sur cellules intactes. Les cellules sont incubées avec l'ascite murine anti-RhBG A-08 diluée au 1/200^e en PBS/SAB 0,2% 1h à température ambiante. Après deux lavages en PBS, l'anticorps anti-IgG de souris couplé à PE dilué au 1/40^e en PBS/SAB 0,2% est ajouté 45 min à 4°C. Après un lavage en PBS, les cellules sont resuspendues dans 500 µL de PBS/SAB 0,2% et 5 µL de TO-PRO-1 (colorant de l'ADN) sont

ajoutés 10 min avant l'analyse par cytométrie en flux, dans le but de visualiser les cellules mortes et de les exclure de la suite de l'analyse.

3.4 - Clonage cellulaire

Lorsque la proportion de cellules exprimant RhBG est inférieure à 95% de la totalité des cellules analysées, un clonage par dilution limite est réalisé. Il s'effectue en plaques de 96 puits à une dilution statistique de 1 et 0,5 cellule par puits. Les cellules obtenues sont une nouvelle fois testées par cytométrie en flux afin de sélectionner au moins trois clones purs en terme d'expression.

3.5 – Immunofluorescence et microscopie confocale

Les cellules HEK293 sauvages ou transfectées sont cultivées à sub-confluence pendant 3 jours sur lamelles recouvertes de poly-L-lysine (BD Sciences) pour les études d'expression membranaire. Une monocouche de cellules MDCK ou LLC-PK1, sauvages ou transfectées, sont cultivées 7 jours à confluence sur des membranes de polycarbonate Transwell (Corning Costar) de 12 mm de diamètre et qui présentent une taille de pore de 0,4 μm , pour les études d'expression polarisée. Les cellules sont ensuite fixées en présence de PBS-paraformaldéhyde à 4% (m/vol) pendant 20 min et lavées en PBS. Les groupements aldéhydes libres sont bloqués par une solution de PBS- NH_4Cl 50 mM pendant 10 min et les cellules sont ensuite lavées en PBS et peuvent être perméabilisées ou non en présence de PBS-SDS 1% (m/vol) pendant 15 min. Après deux lavages en PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires anti-RhBG-Cter de lapin au 1/500^e et/ou anti-ankyrine G murins à 2,5 $\mu\text{g/mL}$ et/ou anti-ZO-1 murin à 4 $\mu\text{g/mL}$, ou l'ascite murine A-08 au 1/3000^e, dans un tampon de blocage des sites non spécifiques (Dako Corp.) pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois par du PBS/SAB 0,5% (m/vol) et incubées 1h à température ambiante avec les Alexa Fluor anti-IgG de lapin et/ou anti-IgG de souris dilués au 1/200^e dans du PBS/SAB 0,5%. Les échantillons sont analysés par microscopie confocale avec un microscope Nikon Eclipse TE300 équipé d'un objectif 60x NA 1.4.

4 - Spectrofluorimétrie en flux interrompu : Stopped-Flow

4.1 - Matériels pour l'analyse du transport facilité de NH_3

Dans une cellule, les flux entrants ou sortants d'ammonium entraînent des variations du pH intracellulaire (pH_i). La technique de spectrofluorimétrie en flux interrompu permet de suivre les variations du pH_i selon les mouvements de l'ammonium dans la cellule en utilisant une sonde fluorescente intracellulaire sensible au pH, la BCECF-AM (2',7'-bis(2-carboxyéthyl)-5-6-carboxy fluorescéine-acétoxyméthyl ester, Sigma Aldrich). La solution est préparée dans du DMSO à une concentration de 0,2 mM. Deux types de tampons sont utilisés : le tampon A contient du NaCl 130 mM, KCl 5 mM, Hepes 10 mM ajusté à pH 7,2 avec du NaOH et le tampon B contient du NaCl 65 mM, NH_4Cl 40 mM, KCl 5 mM, Hepes 10 mM ajusté à pH 7,2 avec du NaOH. L'osmolalité de ces différents tampons a été contrôlée (280 ± 5 mOsm/kg H_2O).

4.2 – Préparation des cellules

8.10^6 cellules HEK293 sauvages ou transfectées sont incubées avec la sonde fluorescente BCECF-AM à 20 μM pendant 20 min à 30°C. La sonde entre dans les cellules qui lui sont perméables. Elle est ensuite clivée par des estérases endogènes libérant la BCECF désestérifiée qui est imperméante et fluorescente. Celle-ci, sensible au pH, permet une mesure fiable des intensités de fluorescence corrélées aux valeurs du pH intracellulaire, dans des conditions où la valeur du pH est comprise entre 7 et 8 (Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005). Après incubation, les cellules sont lavées deux fois par du PBS et enfin une fois par le tampon A par centrifugation, 5 min, 1800 trs/min à température ambiante. Le culot est ensuite resuspendu dans 6 mL de tampon A. Avant de mesurer l'efficacité de transport, les cellules sont laissées 1h à température ambiante.

Lors des tests de phosphorylation, du pervanadate 0,1 mM (25 μ L d'orthovanadate 500 mM, 565 μ L de PBS, 10 μ L H₂O₂ 3%, 3 μ L catalase 10 mg/mL) a été ajouté au milieu de culture 30 min avant de trypsiner les cellules et durant toutes les étapes de lavage avant l'analyse.

4.3 - Mesures du transport

Les mesures du transport d'ammonium sont effectuées à 15°C à l'aide d'un spectrofluorimètre en flux interrompu SFM3 (Biologic) (figure 27). Lorsque les moteurs sont activés, 150 μ L du contenu de chacune des deux seringues (les cellules d'une part et le tampon B d'autre part) sont injectés dans un mélangeur pour pénétrer ensuite dans une cuve d'observation de 30 μ L. La vitesse de l'injection est fixée à 10 mL/s et le temps nécessaire pour que les deux solutions se mélangent et atteignent la cuve d'observation est de l'ordre de 8 ms : c'est le temps mort de l'appareillage. La cuve est éclairée par un faisceau lumineux dont la longueur d'onde d'excitation peut être fixée par un monochromateur (485 nm pour la BCECF). Pour avoir une source lumineuse stable, l'éclairage est assuré par une lampe à arc mercure xénon de 150 W. Dans la cuve, un gradient entrant de 20 mmol de NH₄⁺ est généré suite au mélange volume à volume de la suspension cellulaire et du tampon B. La fluorescence (de l'ordre de 535 nm) émise par les cellules est convertie en intensité électrique par un photomultiplicateur et est ensuite amplifiée par un amplificateur. Le signal enregistré correspond à la cinétique de variation de fluorescence émise par les cellules dans la cuve et est visualisé par informatique. La moyenne de 7 à 9 cinétiques est réalisée et analysée par le logiciel BLOKINE (Biologic) qui détermine d'une part la courbe théorique la plus appropriée, généralement une mono-exponentielle, et d'autre part la constante de vitesse initiale ou constante de temps, k (s⁻¹), correspondant à la moyenne des cinétiques. En effet, l'équation rapportée à la courbe est la suivante :

$$[S]_t = [S]^e_t (1 - \exp^{-kt})$$

$[S]_t$ représente la concentration d'ammonium à l'intérieur de la cellule à l'instant t alors que $[S]^e_t$ représente la concentration en ammonium dans le milieu extracellulaire.

k (s^{-1}), la constante de vitesse initiale est donnée par la relation suivante :

$$k = (A \times P) / V$$

V et A sont, respectivement, le volume et la surface de la cellule et P la perméabilité (Shechter, 1997). En considérant V et A comme constants, k est directement proportionnelle à la perméabilité des cellules à l'ammonium.

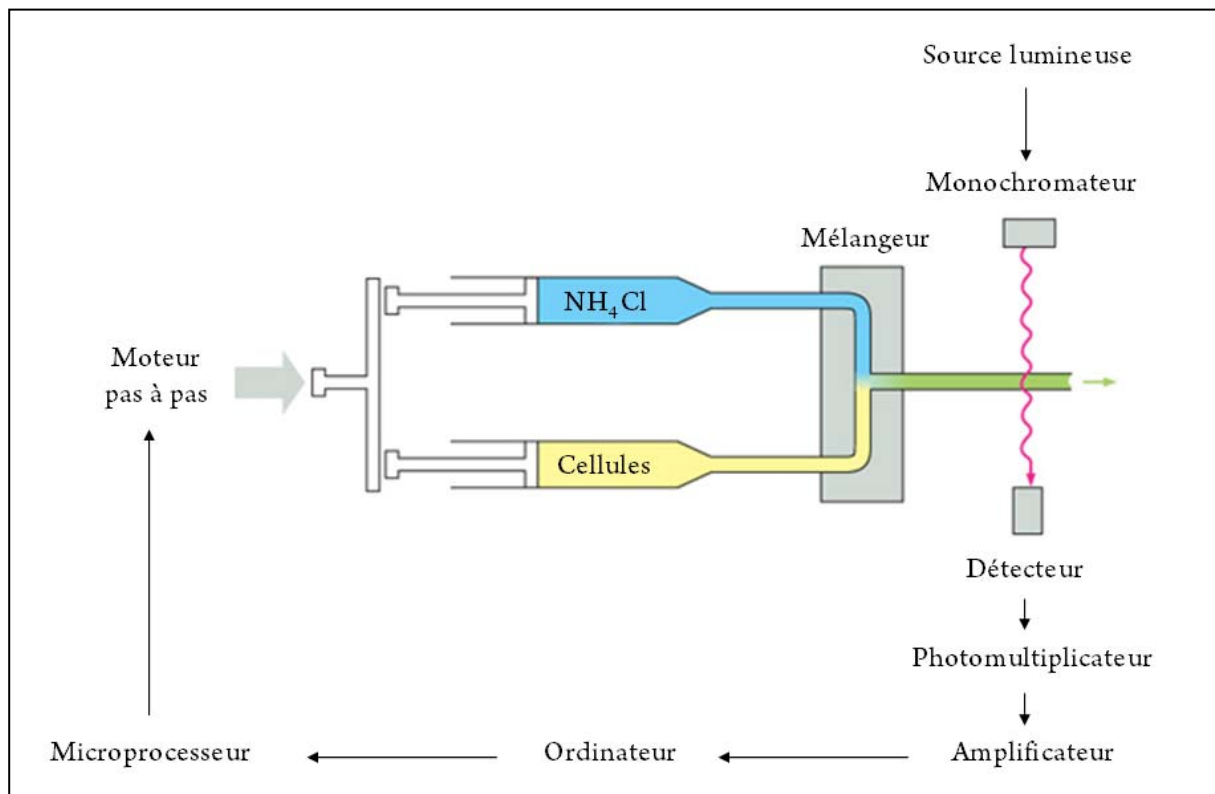


Figure 27. Fonctionnement schématique du spectrophotomètre en flux interrompu.

5 - Biochimie

5.1 - Electrophorèse et transfert de protéines sur membrane

Les protéines sont séparées 1h30 à 180V par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% selon Laemmli (Laemmli, 1970) en présence de tampon Laemmli 3X (Tris-HCl 30mM pH 6,8, EDTA 3mM et SDS 15%). Elles sont par la suite électrotransférées à température ambiante 2h à 30V dans le tampon Tris-HCl 12,5 mM, Glycine 96 mM et éthanol 10% (vol/vol) pH 8,3 (Biorad) sur une membrane de nitrocellulose dont les pores sont de 0,45 µm. Les membranes sont soit colorées au rouge Ponceau (0,1%), soit incubées avec des anticorps.

5.2 - Révélation immunologique et autoradiographique

Après transfert, les sites libres de la membrane sont bloqués 1h à 37°C dans le tampon TBS 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 0,9%), lait écrémé en poudre 5% (m/vol). La membrane est alors incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation douce avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon TBS, lait 5%. Elle est ensuite lavée 3 fois, 10 min à 37°C en présence de TBS-Tween 20 (Biorad) 0,5% (vol/vol) puis une fois 5 min à 37°C dans du TBS-lait 5% avant d'être incubée 45 minutes à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué au 1/1000^e dans le TBS-lait 5%. Deux lavages sont ensuite réalisés pendant 10 min à 37°C par une solution de TBS-Tween 20 0,5% puis 1 fois 30 min par du TBS. La révélation de la réaction enzymatique se fait par chimioluminescence lors de la mise en contact pendant 2 min de la membrane et du mélange des deux réactifs du kit ECL Plus (Amersham Biosciences). Les protéines radioactives sont autoradiographées sur des films Biomax MR (Kodak) ou lors de l'utilisation du Bioimaging Analyser System BAS-1800 (Fujifilm-Raytest).

Les dilutions des anticorps primaires utilisés sont les suivantes :

- anti-RhBG-Cter purifié dilué au 1/3000^e
- ascite anti-RhBG A-08 au 1/5000^e

- anti-Erk1+Erk2 au 1/1500^e
- anti-phosphotyrosine P-Tyr-100 et P-Tyr-102 au 1/2000^e
- anti-phosphotyrosine 4G10 à 1 µg/mL
- sérums S5 anti-phosphopeptides 2831 et 2832 au 1/200^e
- anti-phosphopeptides purifiés PP1 et PP2 à 1 µg/mL

5.3 - Solubilisation de RhBG

Les cellules HEK293 sauvages ou transfectées sont lavées par du PBS, trypsinées et comptées. $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont lysées pendant 1h à 4°C sur roue par 200 µL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 5mM dans lequel sont présents des IP et du Triton X-100 dont la concentration finale est généralement de 1%, mais peut varier de 0,1% à 1% lors des études d'ancrage au squelette sous-membranaire. Les cellules MDCK polarisées durant 7 jours sur filtres Transwell sont lysées *in situ*, la lyse s'effectuant sur plaque d'agitation.

5.4 - Immunoprécipitation de RhBG

Après solubilisation des protéines RhBG, les lysats sont centrifugés à 15000 trs/min, 15 min à 4°C. Des aliquots de lysat sont additionnés de tampon de charge 5X (saccharose 1,25M, SDS 20%, Tris-HCl 250 mM pH 6,8, β-mercaptoéthanol 25%, bleu de bromophénol 1%). Afin d'éliminer toutes les protéines capables de se fixer uniquement aux billes de protéine-A-Sepharose, et pour que les complexes observés soient spécifiques de la protéine RhBG, les lysats sont pré-incubés avec les billes de protéine-A-Sepharose-CL4B (Amersham Biosciences) et du sérum de chèvre 2% pendant 1h à 4°C. Après centrifugation durant 5 min, 2000 trs/min à 4°C, les surnageants sont mélangés 2h à 4°C avec les billes couplées à 1 µg d'anticorps anti-RhBG-Cter purifié. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon de lyse et les immunocomplexes sont élués avec du tampon Laemmli 1X pendant 1 h à température ambiante. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% et transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'ascite murine anti-RhBG A-08 est utilisée

comme anticorps primaire en immunoblot. La révélation de la protéine RhBG immunoprécipitée par l'anti-RhBG-Cter, démontre la spécificité de l'ascite A-08 pour RhBG.

5.5 – Chasse radioactive de RhBG néosynthétisée

L'adressage et le recyclage à la membrane des protéines RhBG néosynthétisées ont été déterminés par une expérience de chasse radioactive. Les cellules HEK293 exprimant RhBG sauvage ou mutée sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre, alors que les cellules MDCK polarisées sont cultivées sur filtres Transwell. Elles sont lavées 2 fois en milieu DMEM déplété en méthionine et cystéine et incubées pendant 30 minutes dans le même milieu complété de 10% de SVF. Les protéines néosynthétisées sont alors radiomarquées par addition de 150 μ Ci de méthionine [35 S]/cystéine [35 S] (Invitrogen) dans le milieu complet pendant 10 min à 37°C pour les cellules HEK293 et d'une durée variable pour les cellules MDCK. Les cellules sont lavées et incubées dans un milieu non radioactif pendant des temps variables à 37°C. Après chaque temps, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid et incubées 30 min à 4°C avec de la Sulfo-NHS-LC-Biotine non pénétrante (Pierce) à 0,5 mg/mL diluée dans un tampon de biotinylation (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,2 mM, MgCl₂ 0,2 mM, pH 7,5). Pour les cellules MDCK, la biotine est ajoutée soit au pôle apical, soit au pôle basolatéral des cellules. Après avoir retiré la biotine, les cellules sont incubées 10 min à 4°C avec de la glycine 10 mM et lavées 2 fois par du PBS. Les cellules sont alors lysées *in situ* et les protéines RhBG immunoprécipitées comme décrit dans la partie 5.4. Les immunocomplexes sont lavés 2 fois avec du tampon de lyse et un quart (200 μ L) est élué par du Laemmli 1X pendant 1h à température ambiante (protéines RhBG totales). Les trois quarts restants sont élués avec du SDS 10% pendant 30 min à température ambiante puis dilués dans 500 μ L de tampon de lyse froid. Le surnageant est alors incubé avec de l'avidine monomérique immobilisée (Pierce) 3h à 4°C pour isoler la fraction de RhBG membranaire. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du tampon de lyse et les protéines sont éluées avec du tampon Laemmli 1X 1h à température ambiante. Les éluats des deux étapes (RhBG total et membranaire) sont soumis à une électrophorèse en gel SDS-PAGE suivie d'un immunoblot avec l'ascite murine anti-RhBG A-08. Des échantillons de RhBG biotinylées et radioactives

sont analysés par le Bioimaging Analyser pour quantifier les protéines membranaires néosynthétisées en fonction du temps.

5.6 – Biotinylation spécifique d'un domaine cellulaire

Une monocouche de cellules MDCK sauvages ou transfectées sont cultivées sur filtre Transwell pendant 7 jours. Des cellules contrôles sont cultivées en parallèle dans des conditions similaires et analysées par microscopie confocale pour vérifier qu'elles ont formé une monocouche polarisée. Les cellules sont radiomarquées par addition de 150 μ Ci de méthionine [35 S]/cystéine [35 S] toute une nuit à 37°C puis lavées par du PBS refroidi avant d'incuber le domaine apical ou basolatéral avec de la biotine, comme cela est décrit dans la partie 5.5 ; la surface non-biotinylée est incubée dans du PBS froid. Les filtres sont alors lavés trois fois puis excisés. La lyse des cellules, l'immunoprécipitation, l'incubation avec l'avidine et l'analyse des protéines RhBG membranaires radiomarquées et biotinylées sont réalisées comme décrit dans la partie 5.5.

5.7 - Phosphorylation in vitro de la protéine de fusion GST-Cter

5.7.1 - Phosphorylation par un lysat cellulaire

10⁷ cellules HEK293 sont lysées dans 1 ml de tampon de lyse (MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150mM, NP40 0,5%, acide okadaïque 1 μ M (inhibiteur de phosphatases), IP) pendant 1h sur une roue à 4°C.

Afin d'éliminer de possibles interactions non spécifiques entre la GST et des protéines cellulaires, le surnageant de lyse est incubé 1h sur une roue à 4°C en présence de 25 μ L de billes glutathion-Sépharose-4B et de 15 μ g de GST native. Après centrifugation à 3000 trs/min, 3 min à 4°C, le surnageant est récupéré et incubé une nuit à 4°C avec 25 μ L de billes glutathion-Sépharose-4B et 15 μ g de GST native ou GST-Cter. Les billes sont par la suite lavées 6 fois avec le tampon de lyse.

La réaction de phosphorylation des 50 μ L de protéines GST ou GST-Cter fixées sur les billes est effectuée par incubation dans 500 μ L de tampon kinase (Hepes 20 mM pH 7,4, MgCl_2 10 mM, acide okadaïque 1 μ M) et 1 μ L d'ATP [$\gamma^{32}\text{P}$] (10 μ Ci) pendant 30 min à 30°C. Les billes sont lavées 6 fois dans 1 mL de tampon de lyse et les protéines sont éluées pendant 5 minutes à 100°C en tampon de charge. Les protéines sont soumises à une électrophorèse en gel SDS-PAGE, électrotransférées puis autoradiographiées.

5.7.2 - Phosphorylation par des kinases purifiées

Après avoir mélangé 15 μ g de protéine GST ou GST-Cter et 25 μ L de billes glutathion-Sépharose-4B (en culot) 2h à 4°C, les billes couplées aux protéines sont lavées trois fois avec 1mL de tampon kinase adéquat : Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,5 pour la kinase CKI ; Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, pH 7,5 pour la kinase CKII ; Tris-HCl 20 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,5 pour la kinase GSK-3 β et HEPES 60 mM, pH 7,5, MgCl_2 5 mM, MnCl_2 5 mM, DTT 1 mM, 3 μ M d'orthovanadate de sodium pour les kinases Src et Syk. Elles sont ensuite incubées 30 min à 30°C avec 50 μ L de tampon kinase, de 10 μ Ci d'ATP [$\gamma^{32}\text{P}$] et des kinases purifiées (100 unités pour CKI (New England Biolabs), 1 unité pour CKII (Calbiochem), 1 unité pour GSK-3 β (Calbiochem) et 100 ng pour Src et Syk (Cell Signaling Technology)). Lorsque l'expérience a été effectuée en présence de deux enzymes, les lavages des billes ainsi que les réactions de phosphorylation ont été réalisés avec un mélange à 50% (vol/vol) des deux tampons correspondants. Les billes sont ensuite lavées 6 fois par une solution de PBS-Triton X-100 0,05% (vol/vol), puis bouillies 5 min en présence de 25 μ L de tampon Laemmli 1X afin d'éluer les protéines qui sont soumises à une électrophorèse en gel SDS-PAGE, électrotransférées et autoradiographiées.

5.8 – Phosphorylation *ex vivo*

Les cellules HEK293 et MDCK cultivées en boîte 6 puits et sur filtres Transwell, respectivement, sont lavées 3 fois en milieu DMEM déplété en phosphate. Elles sont alors incubées dans le même milieu complété de 10% de SVF, additionné de 250 μ Ci

d'orthophosphate ^{32}P et de pervanadate 0,1 mM pour une durée de 2h ou durant toute la nuit. Les cellules sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS puis lysées *in situ* en présence d'orthovanadate 1 mM. RhBG est alors immunoprécipitée et les protéines radiomarquées sont séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE, électrotransférées et révélées par autoradiographie.

RESULTATS

1 – Expression membranaire de RhBG

L'analyse *in silico* par l'outil bio-informatique *Netphos 2.0* (Blom *et al.*, 1999) de l'extrémité C-terminale de RhBG prévoit la présence de 4 sites potentiellement phosphorylables, les sérines S422 et S426, la tyrosine Y429 et la thréonine T456 dont les scores de prédiction sont variés (figure 28).

KLPFLDSPPDSQHYEDQVHWQVPGEHEDKAQRPLRVEEADTQAS...S..Y.....				
Phosphorylation sites predicted:				
Serine predictions				
Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
RhBG	7	PFLDSPPDS	0.935	*S*
RhBG	11	SPPDSQHYE	0.975	*S*
		^		
Threonine predictions				
Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
RhBG	41	EEADTQA--	0.274	.
		^		
Tyrosine predictions				
Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
RhBG	14	DSQHYEDQV	0.732	*Y*
		^		

Figure 28. Prédiction *in silico* des sites potentiels de phosphorylation de RhBG-Cter

La séquence RhBG-Cter, représentée en haut de la figure, a été analysée grâce à l'outil bio-informatique *Netphos 2.0*. Les sérines S422 et S426 ont des scores de prédiction très élevés (0,935 et 0,975, respectivement). Le score de la tyrosine Y429 est élevé (0,732) alors que celui de la thréonine T456 est faible (0,274).

Par ailleurs, la thréonine T456 fait partie d'un domaine potentiel de liaison-PDZ de type I ⁴⁵⁵DTQA⁴⁵⁸ localisé à l'extrémité C-terminale (figure 26). À partir du vecteur d'expression pcDNA3-RhBG, nous avons généré des mutants codant des protéines qui contiennent une alanine ou un acide aspartique en remplacement de chaque résidu sérine, tyrosine et thréonine. Nous avons également muté la tyrosine Y429 en phénylalanine ou en acide glutamique. Les mutations en alanine ou phénylalanine bloquent la phosphorylation, alors que les mutations en acide aspartique ou en acide glutamique miment une phosphorylation constitutive. Un mutant 454Stop dont les 4 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale ont été éliminés, a également été créé pour supprimer le domaine de liaison-PDZ. Le triple mutant alanine F419A/L420A/D421A abolissant la liaison à l'ankyrine G a été préalablement décrit (Lopez *et al.*, 2005).

Les cellules épithéliales rénales humaines HEK293 ont été transfectées par des vecteurs pcDNA3 contenant les différents mutants décrits ci-dessus, puis stabilisées. Des clones cellulaires ont ensuite été obtenus pour chaque mutant. L'analyse par cytométrie en flux des cellules perméabilisées en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin anti-RhBG-Cter décrit précédemment (Quentin *et al.*, 2003) indique que les cellules HEK293 sauvages ou les cellules transfectées par le vecteur pcDNA3 vide n'expriment pas de façon endogène RhBG, alors que tous les mutants de RhBG s'expriment significativement comparés à la protéine sauvage (tableau 4).

Tableau 4. Propriétés de la protéine RhBG mutée sur ses sites potentiellement phosphorylables et exprimée dans les cellules rénales HEK293.

Cellules	Cellules perméabilisées	Cellules intactes		
	Expression (%) ^a	Expression (%) ^a	Constante d'alcalinisation k , s ⁻¹	Efficacité de transport (%) ^b
WT ^c	0	0	0.22 ± 0.068 (14) ^e	0
RhBG	100	100	1.38 ± 0.215 (14)	100
pcDNA3 ^d	nd ^o	0	0.24 ± 0.025 (3)	2
S422A	115	102	1.05 ± 0.081 (4)	70
S422D	78	70	0.84 ± 0.078 (4)	76
S426A	107	105	1.03 ± 0.072 (4)	66
S426D	79	68	0.84 ± 0.065 (4)	78
Y429A	79	113	1.31 ± 0.278 (3)	83
Y429F	83	98	1.32 ± 0.110 (4)	97
Y429D	128	115	0.28 ± 0.034 (3)	5
Y429E	99	65	0.25 ± 0.028 (3)	3
454Stop	180	71	0.88 ± 0.059 (3)	79
T456A	nd	108	1.17 ± 0.221 (4)	76
T456D	nd	104	1.19 ± 0.255 (4)	81

^a : valeurs relatives à la MIF déterminée pour RhBG

^b : valeurs relatives des constantes d'alcalinisation corrigées pour l'expression membranaire de RhBG et après soustraction de la constante de diffusion passive (WT)

^c : cellules HEK293 sauvages

^d : cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 vide

^e : n valeurs entre parenthèses

^o : non déterminée

En effet, les mutants présentent des moyennes d'intensités de fluorescence (MIF) allant de 78% pour S422D à 180% pour le 454Stop. Cependant, l'analyse par immunofluorescence révèle une accumulation intracellulaire de RhBG variable en plus d'un fort marquage à la membrane cytoplasmique (figure 29A). Le mutant 454Stop présente un marquage interne important comparé aux cellules exprimant la protéine RhBG sauvage, qui peut être expliqué par la surexpression de la protéine mutée. En effet, la MIF déterminée sur ces cellules mutantes est de 180% comparée à celle des cellules exprimant la protéine RhBG sauvage. L'analyse de l'impact des différentes mutations sur l'activité de transport de NH₃ de RhBG nécessite une comparaison du niveau d'expression de RhBG uniquement à la surface des cellules. C'est pourquoi nous avons développé un nouvel anticorps polyclonal de souris (ascite A-08) dirigé contre les boucles extracellulaires de RhBG. Après transfection stable par le vecteur pcDNA3-RhBG, des cellules épithéliales rénales murines (cellules mIMCD-3) ont été lysées puis injectées à des souris. Les ascites ont ensuite été prélevées. Les cellules servant

à l'immunisation étant d'espèce identique à l'animal produisant l'ascite, nous avons favorisé une réponse immune uniquement liée à la protéine RhBG humaine.

L'analyse par cytométrie en flux de cellules HEK293 non perméabilisées en utilisant l'ascite A-08 révèle des niveaux d'expression de RhBG à la surface cellulaire compris entre 65 et 113% comparé aux cellules exprimant la protéine RhBG sauvage (tableau 4). L'analyse par microscopie de fluorescence en utilisant l'ascite A-08 révèle un marquage important de la membrane cytoplasmique de tous les clones cellulaires non perméabilisés (figure 29B). L'absence de marquage membranaire des cellules transfectées par le vecteur pcDNA3 vide confirme que la protéine RhBG ne s'exprime pas de façon endogène.

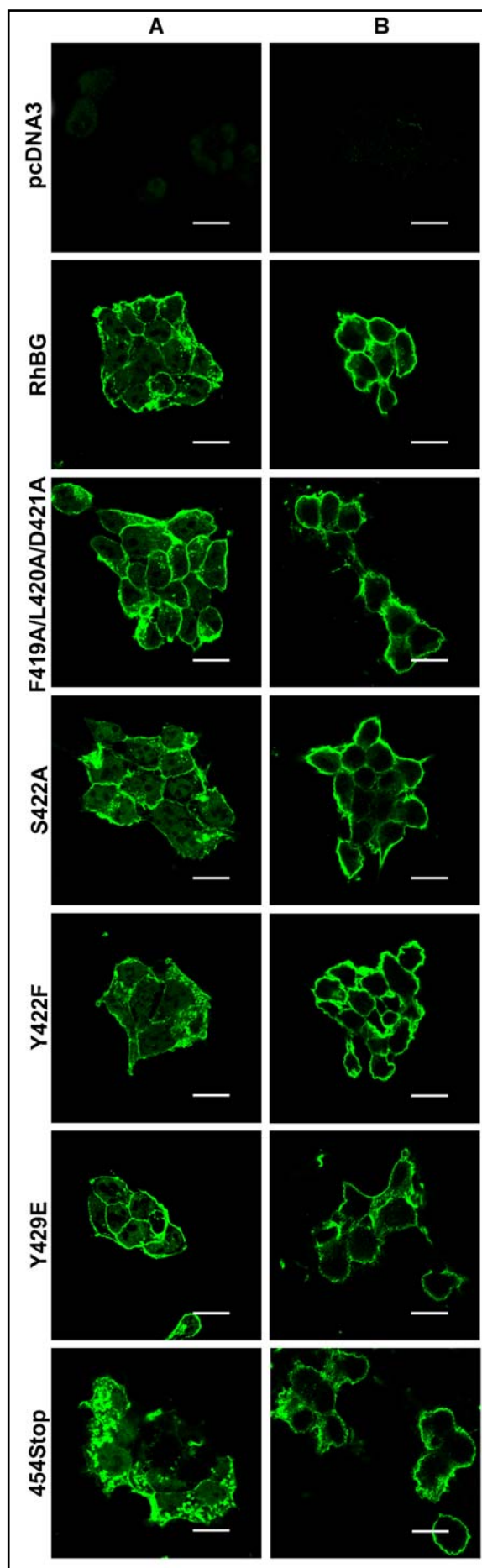


Figure 29. Analyse microscopique par immunofluorescence de l'expression des mutants de RhBG-Cter dans les cellules HEK293.

Les clones de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 vide (*pcDNA3*) exprimant RhBG sauvage (*RhBG*) ou mutée ont été cultivées sur lamelles poly-L-lysine et fixées par du paraformaldéhyde 4%. *A*, les cellules ont été perméabilisées par du SDS 1% puis incubées avec les anticorps de lapin anti-RhBG-Cter et l'Alexa Fluor 488 de chèvre anti-IgG de lapin. *B*, les cellules ont été directement incubées avec l'ascite de souris A-08 et l'Alexa Fluor 488 de chèvre anti-IgG de souris. S422D, S426A, S426D, Y429A, Y429D, T456A et T456D (non représentées) présentent un marquage interne et cytoplasmique similaire en *A*, et un marquage uniquement membranaire en *B*. Barre d'échelle, 15 µm.

2 - Activité de transport de NH_3 de RhBG

Puisque la phosphorylation de protéines transmembranaires est connue pour médier la régulation de leur fonction, la capacité de transporter le NH_3 par une protéine RhBG mutée sur ses sites potentiellement phosphorylables a été étudiée. Les clones de cellules HEK293 recombinantes ont été incubés avec la sonde fluorescente sensible aux variations de pH, la BCECF, et analysées par spectrophotométrie en flux interrompu, comme cela a été décrit précédemment (Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005). Les cinétiques d'augmentation de fluorescence (correspondant à une augmentation de pH intracellulaire) de cellules HEK293 exposées à un gradient entrant de 20 mmol NH_4^+ , pH 7,2 ont été enregistrées (figure 30).

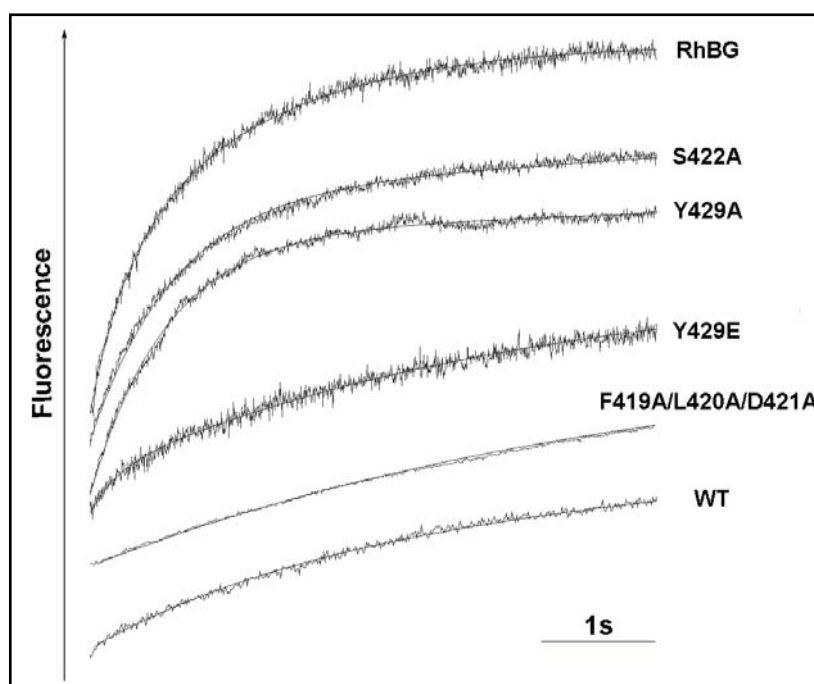


Figure 30. Cinétique caractéristique de variations de fluorescence dans les cellules HEK293 exprimant les mutants de RhBG-Cter et exposées à un gradient d'ammonium.

Les cellules, incubées avec la sonde fluorescente sensible aux variations de pH, la BCECF, ont été exposées à un gradient entrant iso-osmotique de 20 mEq NH_4^+ à 15°C. Les changements de fluorescence dépendant du pH_i ont été suivis par un spectrofluorimètre en flux interrompu. Les données de 7 à 9 cinétiques ont été moyennées et ajustées à une fonction mono-exponentielle en utilisant le logiciel Biokine (Bio-Logic) permettant de calculer les constantes d'alcalinisation (k , s^{-1}). WT, cellules HEK293 non transfectées. S422D, S426A, S426D, Y429F, 454Stop, T456A et T456D (non représentés) présentent des cinétiques similaires à S422A et Y429A. Le profil d'Y429D (non représenté) ressemble à celui d'Y429E et de F419A/L420A/D421A. Les expériences ont été répétées au moins 3 ou 4 fois pour déterminer les valeurs de k dans le tableau 4.

Nous avons alors calculé les constantes d'alcalinisation qui reflètent l'accentuation des courbes. Comme le montre le tableau 4, l'alcalinisation est environ 6 à 7 fois plus rapide dans les cellules HEK293 exprimant la protéine RhBG que dans les cellules non transfectées (*WT*) ou les cellules transfectées par le plasmide pcDNA3 vide (*pcDNA3*) (les constantes sont de $1,38 \pm 0,215 \text{ s}^{-1}$ par opposition à $0,22 \pm 0,068 \text{ s}^{-1}$ ou $0,24 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$ respectivement). Les cellules exprimant les mutants S422A, S422D, S426A, S426D, Y429A, Y429F, T456A et T456D présentent des constantes légèrement diminuées ou similaires comparées aux cellules exprimant la protéine RhBG sauvage. À l'inverse, les cellules exprimant les mutants Y429D et Y429E présentent une diminution drastique de leur taux d'alcalinisation ($0,28 \pm 0,034 \text{ s}^{-1}$ et $0,25 \pm 0,028 \text{ s}^{-1}$, respectivement). Les constantes ont été corrigées en tenant compte du niveau d'expression membranaire de chaque protéine mutée en comparaison avec RhBG, et en soustrayant la constante de diffusion passive des cellules non transfectées (*WT*). Ces valeurs relatives (tableau 4) indiquent que toutes les mutations des sérines S422 et S426, de la thréonine T456, ainsi que les mutations de la tyrosine Y429 en alanine ou phénylalanine, ont des effets mineurs sur le taux d'alcalinisation (l'efficacité de transport oscille entre 66 et 97% comparée à RhBG). Il est à noter que la mutation 454Stop qui supprime le possible domaine de liaison-PDZ (contenant la thréonine T456) n'altère pas la capacité de transport de RhBG et aboutit à une efficacité de transport identique à celle des mutants T456A et T456D (79% contre 76% et 81%, respectivement). À l'inverse, les mutations Y429D et Y429E diminuent le taux d'alcalinisation à 5% et 3%, respectivement, comparées à RhBG sauvage.

Ces résultats indiquent que parmi les 4 sites potentiellement phosphorylables présents dans l'extrémité C-terminale de RhBG, seules les mutations de la tyrosine Y429 en acide aspartique ou en acide glutamique qui miment une phosphorylation constitutive, diminuent de façon drastique la capacité de transport de NH_3 de la protéine.

3 – Phosphorylation de RhBG

3.1 – Phosphorylation *in vitro*

Pour cette étude, nous avons réalisé la construction du plasmide d'expression procaryote pGEX-5X-3-RhBG-Cter contenant la séquence nucléotidique codant la Glutathion-S-Transférase (GST) fusionnée à celle codant l'extrémité C-terminale de RhBG (RhBG-Cter) et vérifié par séquençage que les deux ADN étaient bien assemblés dans la même phase de lecture (Matériels et Méthodes). Le principe des tests de phosphorylation *in vitro* repose sur la méthode d'interaction « GST-pulldown ». En effet, cette technique permet d'identifier des partenaires protéiques en associant la protéine étudiée fusionnée à la GST à des extraits cellulaires ou des protéines connues. Ainsi, la protéine de fusion GST-Cter a été incubée d'abord en présence d'un extrait cellulaire puis en présence de kinases purifiées, permettant ainsi de déterminer si RhBG-Cter est phosphorylable, puis de définir les éventuels couples sérine-kinase et tyrosine-kinase intervenant dans sa phosphorylation.

3.1.1 – Production des protéines de fusion

Après transformation des bactéries *E. coli* BL21 par le plasmide pGEX-5X-3-vide ou pGEX-5X-3-RhBG-Cter, les protéines GST ou GST-Cter ont été produites, puis couplées à des billes glutathion-Sépharose-4B. Afin de s'assurer de la pureté et de l'intégrité des protéines de fusion éluées, 1 µg des protéines produites a été testé par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% en conditions dénaturantes (figure 31).

Les profils de migration des protéines GST et GST-Cter révèlent des bandes de taille attendue : respectivement 26 kDa et 31 kDa. Ce résultat indique que seules les protéines GST produites ont été purifiées par les billes. Dans la piste GST-Cter, de fines bandes de taille variant de 26 kDa à 31 kDa correspondent à une dégradation mineure de la protéine GST-Cter.

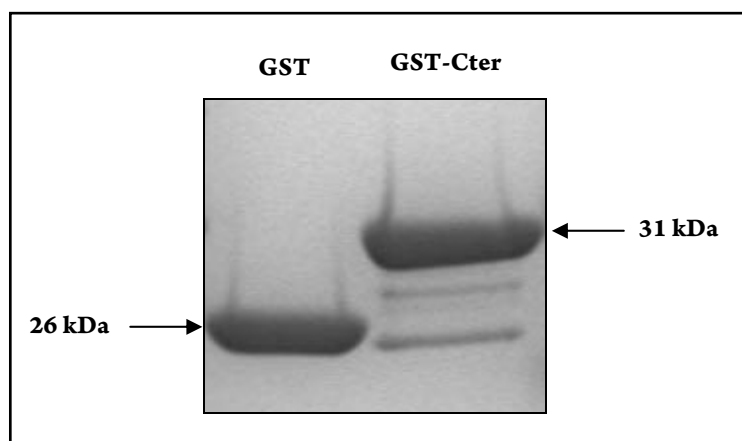


Figure 31. Contrôle de production des protéines GST et GST-Cter.

Les protéines GST et GST-Cter produites dans *E. coli* BL21 ont été couplées à des billes de glutathion-Sépharose-4B. 1 µg de protéine éluée a été analysé par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% et coloré en bleu de Coomassie.

3.1.2 – Phosphorylation par un extrait cellulaire

Pour démontrer que RhBG-Cter est phosphorylable, la protéine de fusion GST-Cter couplée aux billes a été incubée en présence d'un extrait cellulaire de HEK293 ainsi que d'ATP radiomarqué au [^{32}P]. Les protéines totales ont ensuite été séparées par électrophorèse, électrotransférées et révélées par autoradiographie (figure 32).

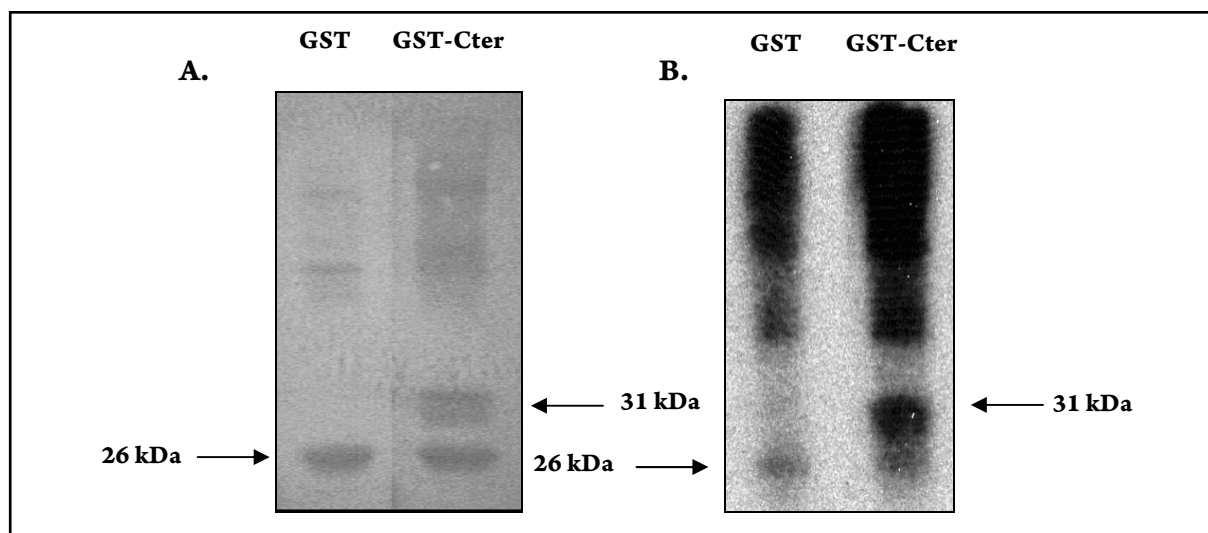
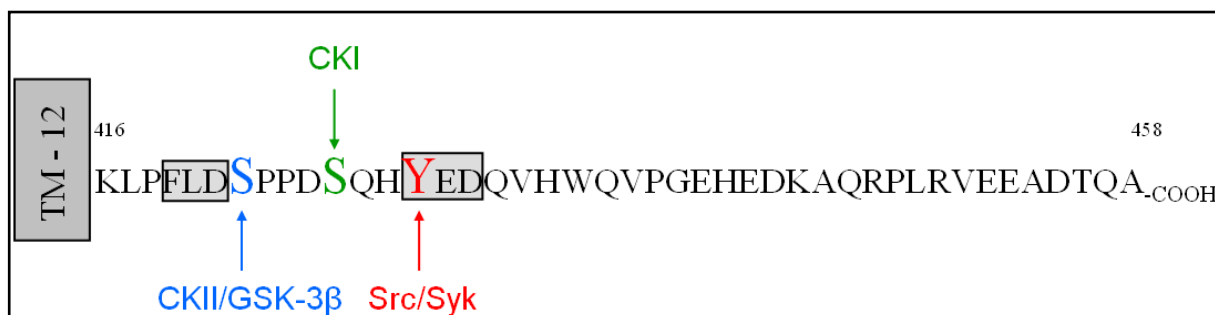


Figure 32. Test de phosphorylation de RhBG-Cter par un extrait cellulaire de HEK293.

Les protéines GST et GST-Cter ont été mises en contact d'un extrait cellulaire de HEK293 et d'ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, puis séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE 12,5% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. A, coloration au rouge Ponceau. B, autoradiographie.

Afin d'identifier le(les) résidu(s) et la(les) kinase(s) responsables de la phosphorylation du domaine C-terminal intracytoplasmique de RhBG, nous avons étudié *in silico* la séquence de RhBG-Cter grâce à divers outils bio-informatiques (KinasePhos 2.0, NetphosK, Prosite et Group-based Phosphorylation Scoring (GPS)) (figure 33).



Trois sites sont reconnus *in silico* par certaines enzymes avec un score de prédiction élevé : la sérine S422 est reconnue par la Caséine Kinase II (CKII) et/ou la Glycogène Synthétase Kinase 3β (GSK-3β), la sérine S426 est reconnue par la Caséine Kinase I (CKI) et la tyrosine Y429 par Src ou Syk. La thréonine T456 ne semble pas être un site consensus reconnu par une enzyme.

- 97 -

3.1.3.1 – Sérines S422 et S426

Des expériences de phosphorylation *in vitro* de RhBG-Cter ont été réalisées en présence des enzymes purifiées CKI, CKII et GSK-3 β et d'ATP marqué au [32 P] (figure 34). RhBG-Cter est phosphorylée par CKII (piste 8) et par CKI (piste 2). Le signal plus faible pour CKII (figure 34B) peut s'expliquer par une quantité moins importante de protéines présentes dans la piste 8 (figure 34A). L'addition de GSK-3 β à CKI (piste 6) augmente le signal par rapport à l'action de CKI seule, alors que RhBG-Cter n'est pas phosphorylée par GSK-3 β (piste 4). Cette dernière observation rend compte : i) de la présence nécessaire d'une sérine phosphorylée dans le voisinage de la sérine ciblée par GSK-3 β pour que cette kinase puisse agir (Fiol *et al.*, 1987), ii) d'un effet additif de GSK-3 β sur l'action de CKI (Hagen and Vidal-Puig, 2002). Comme attendu, dans toutes les expériences contrôle (pistes 1, 3, 5 et 7), la protéine GST native n'est pas phosphorylée. Ces résultats semblent donc confirmer les prédictions de l'analyse *in silico* : les sérines S422 et S426 de RhBG seraient phosphorylées respectivement par CKII/GSK-3 β et CKI.

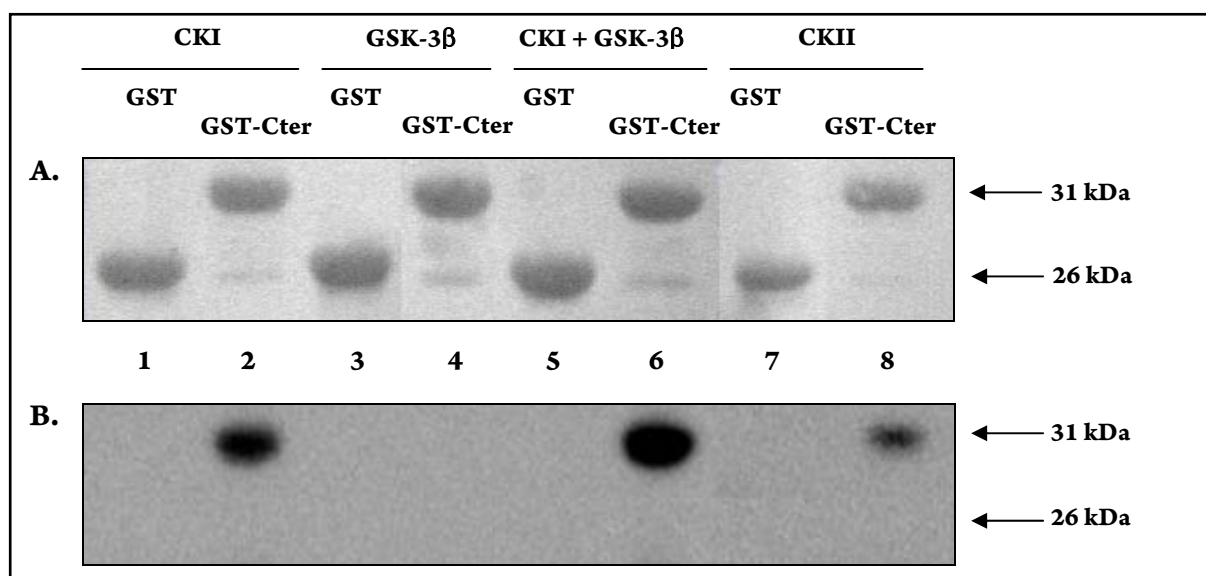


Figure 34. Tests de phosphorylation *in vitro* de RhBG-Cter en présence de sérine kinases purifiées.

15 μ g de GST ou GST-Cter ont été incubés en présence d'ATP- $[\gamma^{32}\text{P}]$ et de CKI, 100 unités (pistes 1 et 2), GSK-3 β , 1 unité (pistes 3 et 4), CKI et GSK-3 β , 100 et 1 unités respectivement (pistes 5 et 6) et CKII, 1 unité (pistes 7 et 8). Les échantillons ont été analysés comme dans la figure 32. A, coloration au rouge Ponceau. B, autoradiographie dont les temps d'exposition ont été de 15 minutes concernant CKI et GSK-3 β , de 30 minutes pour CKII.

Afin de s'assurer de la spécificité de phosphorylation de ces résidus, nous avons généré à partir du plasmide pGEX-5X-3-RhBG-Cter, des simples et doubles mutants codant une protéine dont les sérines S422 et/ou S426 sont substituées en alanine. Ces mutants ont été incubés en présence des kinases CKI ou CKII et d'ATP marqué au [32 P] (figure 35).

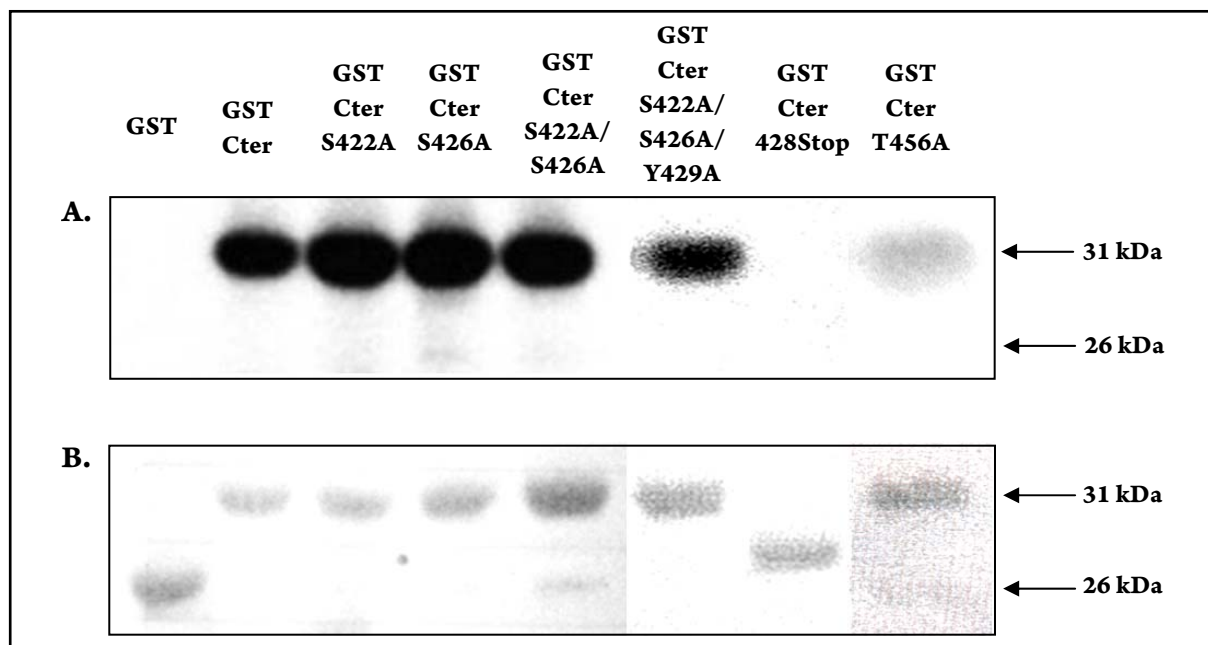


Figure 35. Tests de phosphorylation *in vitro* de mutants de RhBG-Cter par CKI.

Les protéines GST et GST-Cter mutées ont été traitées comme indiqué dans la figure 34. A, autoradiographie. B, coloration au rouge Ponceau. Les résultats sont identiques en présence de CKII.

Ces résultats confirment qu'en présence de CKI ou CKII, RhBG-Cter est bien phosphorylée contrairement à la GST seule. Lorsque la sérine S422 et/ou la sérine S426 est(sont) mutée(s) en alanine, nous observons également un signal de forte intensité. Il semble donc improbable que ces sérines soient le substrat des kinases CKI et CKII. Pour déterminer la nature du résidu impliqué dans la phosphorylation de RhBG-Cter, nous avons réalisé trois nouveaux mutants :

- un triple mutant alanine S422A/S426A/Y429A. Ces mutations permettent de vérifier que la tyrosine Y429 n'est pas impliquée. La présence d'un signal fortement radioactif (figure 35A) nous indique que la tyrosine Y429, en plus des sérines S422 et S426, n'est pas le site de reconnaissance des kinases CKI et CKII.

- un mutant 428Stop dont les 30 derniers acides aminés ont été délétés jusqu'à la tyrosine Y429 incluse. Il ne contient que les deux sérines comme sites potentiellement phosphorylables (figure 33). Ce mutant de délétion de RhBG-Cter ne présente pas de bande radioactive, signifiant que RhBG-Cter n'est plus phosphorylée.

- un simple mutant alanine de la thréonine T456. En effet, la tyrosine Y429 n'étant pas responsable de l'état de phosphorylation de la protéine par CKI ou CKII, le résidu T456 est le dernier site potentiellement phosphorylable présent dans l'extrémité C-terminale de RhBG. Le signal observé pour ce mutant est très faible et nous indique que RhBG-Cter n'est plus ou peu phosphorylée lorsque la thréonine T456 est mutée en alanine.

L'observation des résultats de ces nouveaux mutants nous montre que la thréonine T456 semble être le site de reconnaissance des enzymes CKI et CKII. Cette conclusion est surprenante puisque : i) le score de prédiction *in silico* de la thréonine T456 comme site potentiel de phosphorylation est très faible (0,274, figure 28), ii) les outils bioinformatiques de prédiction de kinase nous indiquent que la thréonine T456 ne fait partie d'aucun site consensus de reconnaissance de kinases. Ce résidu, ainsi que les sérines S422 et S426, n'ayant pas une influence significative sur l'efficacité de transport de NH_3 de RhBG (tableau 4), nous n'avons pas poursuivi nos investigations sur la phosphorylation de ces acides aminés.

3.1.3.2 – Tyrosine Y429

En raison de l'incapacité à transporter le NH_3 des mutants Y429D et Y429E (tableau 4), nous avons tout particulièrement étudié la phosphorylation de la tyrosine Y429. Des protéines de fusion GST-Cter et GST-Cter Y429A ont été produites dans un premier temps dans les bactéries TKB1 qui contiennent un gène codant une tyrosine kinase elk permettant la production de protéines phosphorylées sur tyrosine. Ces protéines ont ensuite été analysées par gel SDS-PAGE, transférées sur membrane et immunoblottées.

La protéine GST-Cter, mais pas la protéine GST seule, réagit fortement avec l'anticorps anti-phosphotyrosine P-Tyr-100 (figure 36A, *panneau du haut*). Des résultats identiques ont été obtenus avec deux autres anticorps anti-phosphotyrosine, P-Tyr-102 et 4G10 (non représentés). Le signal avec l'anticorps est aboli en présence du mutant Y429A, indiquant que la phosphorylation de RhBG-Cter dans les bactéries TKB1 est spécifique de ce

résidu. Nous avons vérifié que des quantités similaires de protéines de fusion ont été chargées sur le gel par une coloration au rouge Ponceau (figure 36A, *panneau du bas*).

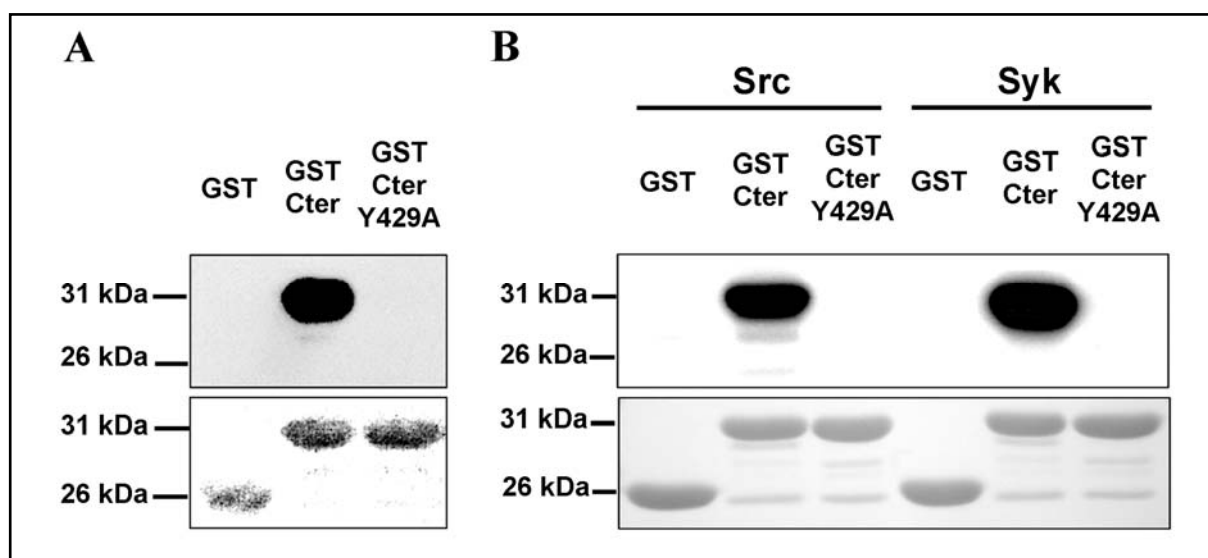


Figure 36. Phosphorylation de RhBG sur la tyrosine Y429.

A, Panneau du haut, les protéines recombinantes purifiées GST, GST-Cter et GST-Cter Y429A ont été produites dans les bactéries *E. coli* TKB1. La phosphorylation des protéines GST a été analysée par immunoblot en utilisant l'anticorps anti-phosphotyrosine P-Tyr-100. *B, Panneau du haut*, Les protéines GST ont été phosphorylées en présence d'ATP- $[\gamma^{32}\text{P}]$ par les kinases purifiées Src ou Syk. La phosphorylation a été analysée par autoradiographie. *A et B, panneaux du bas*, coloration au rouge Ponceau.

Etant donné que la tyrosine Y429 fait partie d'un site consensus de reconnaissance des kinases Src et Syk, selon la méthode GPS, les mêmes protéines de fusion GST ont été produites dans les bactéries BL21 et incubées avec de l'ATP- $[\gamma^{32}\text{P}]$ et les kinases purifiées Src ou Syk. *In vitro*, GST-Cter est un substrat pour les deux enzymes, contrairement à la GST seule (figure 36B). L'absence de phosphorylation du mutant Y429A confirme la spécificité des réactions enzymatiques. La coloration au rouge Ponceau montre que des quantités équivalentes de protéines ont été utilisées.

3.2 – Phosphorylation *ex vivo*

RhBG-Cter étant phosphorylée *in vitro* sur la tyrosine Y429, nous avons étudié la phosphorylation *ex vivo* de la protéine par différentes approches : un marquage métabolique

au ^{32}P , un test avec un anticorps anti-phosphopeptide spécifique de la tyrosine Y429 et enfin une analyse fonctionnelle.

3.2.1 - Marquage métabolique

Après traitement par un inhibiteur de phosphatase spécifique des tyrosine-kinases, le pervanadate, des cellules HEK293 ou MDCK polarisées exprimant la protéine RhBG ont été radiomarquées au ^{32}P . Puis RhBG a été solubilisée, immunoprécipitée et la présence de protéines radioactives a été analysée par autoradiographie.

Les résultats (non représentés) ne permettent pas de dire que RhBG est phosphorylée *ex vivo* puisqu'il n'a pas été possible de visualiser la protéine radiomarquée, le marquage métabolique ayant eu lieu 2 h ou sur la nuit.

3.2.2 – Anticorps anti-phosphopeptide spécifique de la tyrosine Y429

RhBG, en plus de la tyrosine Y429, présente 4 tyrosines dans les boucles intracellulaires prédites de la protéine (figure 37).

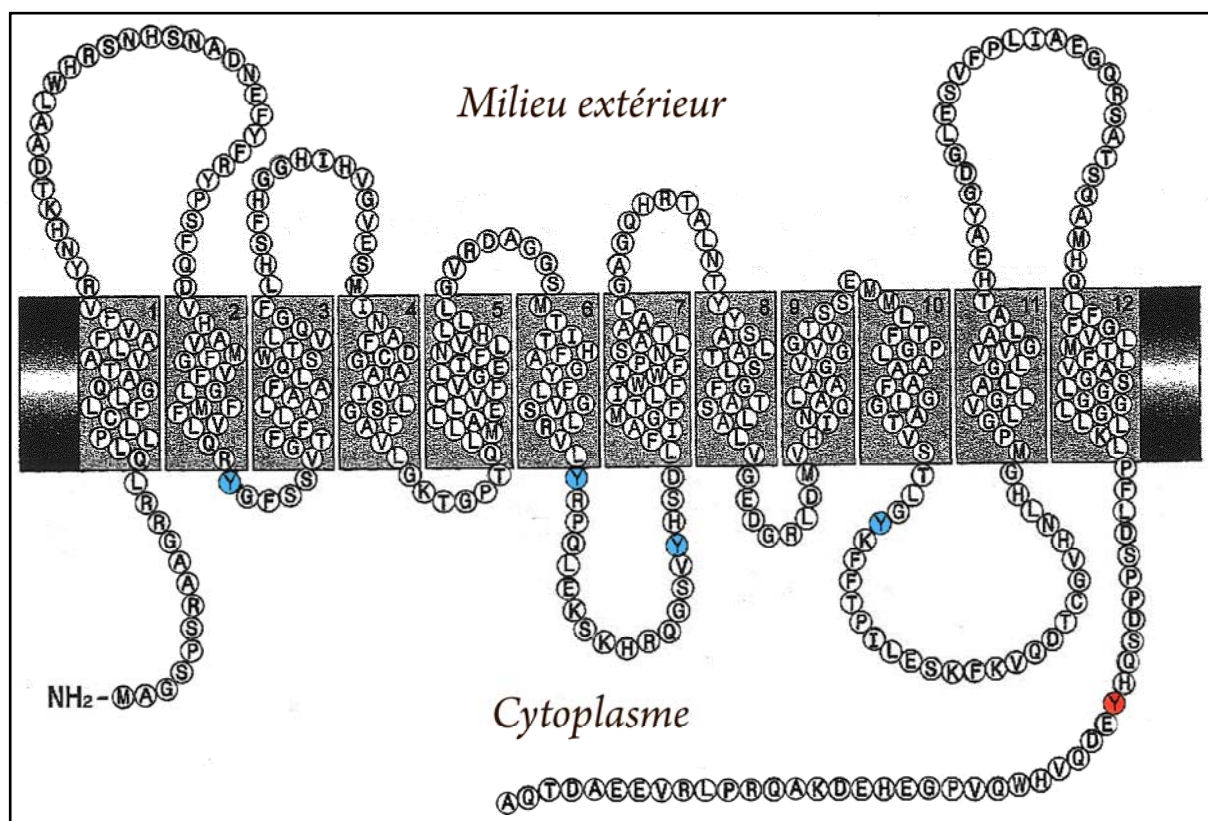


Figure 37. Modèle moléculaire de RhBG.

L'analyse hydrophatique a été réalisée par la méthode de Kyte-Doolittle. En bleu sont représentées les tyrosines localisées dans les boucles intracellulaires et en rouge, la tyrosine Y429 localisée dans RhBG-Cter. D'après Huang and Liu, 2001.

Dans le but d'étudier la phosphorylation *ex vivo* de la tyrosine Y429, deux anticorps de lapin anti-phosphopeptide spécifiques de cette tyrosine ont été produits. Dans l'éventualité d'une phosphorylation de la(des) sérine(s) S422 et/ou S426, deux phosphopeptides contenant ou non ces résidus ont été synthétisés (les séquences des deux phosphopeptides PP1 et PP2 sont représentées dans la partie Matériels et Méthodes). Le mélange des deux peptides a été injecté à deux lapins. Des immunosérums ont ensuite été prélevés à différents temps et à partir du dernier prélèvement, deux anticorps ont été purifiés, le premier étant spécifique de PP1 et le second de PP2. La reconnaissance spécifique, par les sérums, des phosphopeptides injectés a été obtenue par dot-blots (figure 38).

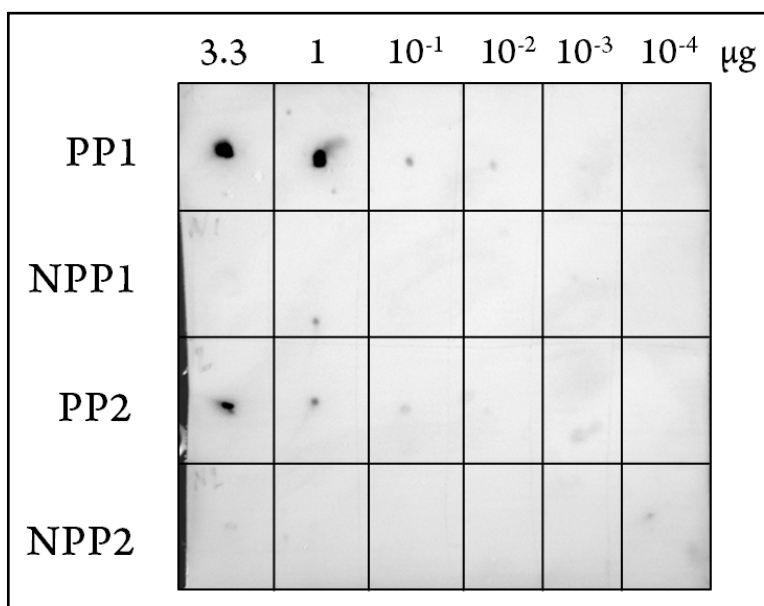


Figure 38. Spécificité des sérums de lapin anti-phosphopeptide vis-à-vis de la tyrosine Y429.

Des quantités décroissantes (3,3 à 10⁻⁴ μg) de peptide ont été déposées sur membrane PVDF. Le sérum S5 du lapin 2831 dilué au 1/200^e a été utilisé pour la révélation. PP1, PhosphoPeptide 1. NPP1, Non PhosphoPeptide 1. PP2, PhosphoPeptide 2. NPP2, Non PhosphoPeptide 2. Les résultats pour le sérum du lapin 2832 sont identiques (non représentés).

La révélation de points d'intensité dégressive avec la quantité décroissante de phosphopeptides indique que les sérums des deux lapins reconnaissent spécifiquement les peptides dans lesquels la tyrosine Y429 est phosphorylée, puisqu'aucun signal n'est visible pour les non phosphopeptides. Cependant, après purification des sérums, les anticorps obtenus ne reconnaissent ni les phosphopeptides, ni les non phosphopeptides (non représentés).

L'utilisation de ces sérums pour tenter de révéler une protéine RhBG phosphorylée *ex vivo*, après traitement par le pervanadate de cellules HEK293 ou MDCK polarisées, solubilisation et immunoprécipitation de RhBG par l'anti-RhBG-Cter, ne nous a pas permis de visualiser, lors des premiers essais, une bande spécifique de la protéine par immunoblot. La phosphorylation de protéines pouvant être un phénomène très rapide et très labile, nous n'avons pas réussi à mettre au point les conditions optimales pour visualiser la protéine RhBG phosphorylée sur la tyrosine Y429. C'est pourquoi nous avons démarré une collaboration avec le Dr A. Toye (Université de Bristol, Royaume-Uni), qui a récemment mis au point les

conditions expérimentales pour visualiser la phosphorylation *ex vivo* de l'AE1 avec des anticorps anti-phosphopeptide et pourrait de ce fait nous aider à démontrer que RhBG est phosphorylée *ex vivo* sur sa tyrosine Y429.

3.2.3 – Test fonctionnel

Dans le but d'explorer l'impact de la phosphorylation sur tyrosine, sur l'activité de RhBG *ex vivo*, nous avons traité des cellules HEK293 exprimant la protéine RhBG sauvage ou le mutant Y429A par le pervanadate, avant d'étudier leur capacité à transporter NH₃.

L'efficacité de transport des cellules exprimant la protéine RhBG sauvage, traitées par le pervanadate, présente une diminution d'environ 60% par rapport aux cellules non traitées (figure 39). Au contraire, lorsque les cellules expriment le mutant RhBG dont la tyrosine Y429 est mutée en alanine, le traitement par le pervanadate n'a aucun effet sur sa fonction de transport de NH₃. L'altération du transport par le pervanadate dans les cellules exprimant la protéine RhBG sauvage est en accord avec la chute de l'activité engendrée par les mutants Y429D/E (tableau 4). En effet, une inhibition par des protéines phosphatases spécifiques des tyrosines mime une activation de la phosphorylation de ces résidus.

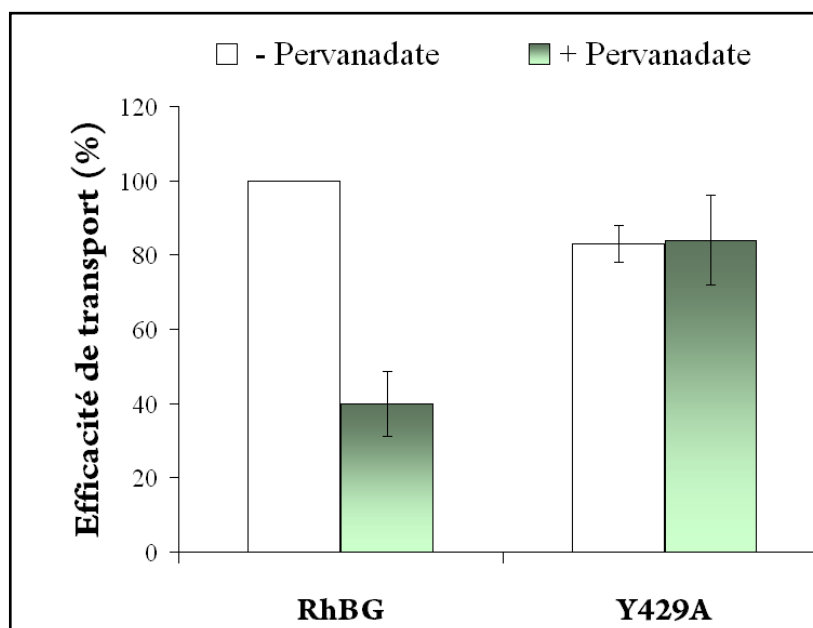


Figure 39. Phosphorylation et efficacité de transport de RhBG.

Effet du pervanadate sur l'efficacité de transport de NH_3 dans les cellules HEK293 exprimant la protéine RhBG ou le mutant Y429A. Les efficacités de transport sont exprimées en valeurs relatives de constantes d'alcalinisation corrigées pour l'expression membranaire de RhBG native, comme décrit dans le tableau 4.

Par conséquent, l'absence d'inhibition du transport par le pervanadate observée pour le mutant Y429A ainsi que l'effet délétère des mutations Y429D/E démontrent que la phosphorylation spécifique de la tyrosine Y429 aboutit à une régulation négative du transport de NH_3 .

4 – Adressage et ancrage de la protéine RhBG mutée sur la tyrosine Y429

4.1 – Adressage à la membrane basolatérale

La tyrosine Y429 a été préalablement décrite par notre laboratoire comme faisant partie du signal d'adressage à la membrane basolatérale, YED ((Lopez *et al.*, 2005) et figure 26). Dans le but de déterminer l'influence de la phosphorylation de cette tyrosine sur l'expression polarisée de RhBG, des cellules MDCK ont été transfectées stablement avec les mutants Y429A, Y429F, Y429D et Y429E. Des monocouches confluentes de clones exprimant

les différentes protéines recombinantes ont été cultivées sur des filtres perméables, leur permettant ainsi de se polariser, puis ont été analysées par microscopie confocale (figure 40A).

La protéine RhBG sauvage est localisée à la membrane basolatérale (sections XY horizontales et XZ, *vert*), en comparaison avec le marquage ZO-1 (XZ, *rouge*) représentatif des jonctions serrées. Les mutants Y429F et Y429A présentent un profil d'expression non polarisée aux domaines apicaux et basolatéraux des cellules. Ce résultat est en accord avec l'étude mutationnelle précédente de notre laboratoire dans laquelle les simples mutants Y429A, E430A et D431A du signal d'adressage étaient exprimés aux deux domaines des cellules MDCK polarisées (Lopez *et al.*, 2005). À l'inverse, les mutants Y429E et Y429D sont correctement localisés à la face basolatérale des cellules. Les expériences de biotinylation et d'immunoprécipitation sur des monocouches polarisées des mêmes clones (figure 40B) révèlent que la protéine RhBG (qui migre à une masse moléculaire apparente de 50 kDa) et le mutant Y429E sont exprimés quasi-exclusivement à la membrane basolatérale (89% et 91%, respectivement). L'expression du mutant Y429F est dépolarisée mais reste en majorité basolatérale (31% et 69% de protéines à la membrane apicale et basolatérale, respectivement), probablement parce que les acides aminés E430 et D431 du motif YED d'adressage à la membrane basolatérale ne sont pas touchés. En effet, notre laboratoire avait préalablement montré que les 3 résidus du motif étaient nécessaires et avaient un effet additif sur la machinerie d'adressage (Lopez *et al.*, 2005). Les mutants Y429D et Y429A (non représentés) présentent une distribution similaire aux clones Y429E et Y429F, respectivement.

Nous avons également analysé l'expression des autres mutants de l'extrémité C-terminale de RhBG, S422A, S422D, S426A, S426D, T456A, T456D et 454Stop, dans les cellules MDCK polarisées. Tous montrent un adressage basolatéral normal de RhBG (non représentés).

Ces résultats indiquent que lorsque l'on remplace la tyrosine Y429 du motif YED par un résidu chargé négativement (acide aspartique ou acide glutamique) mimant une phosphorylation constitutive, l'expression de RhBG dans les cellules MDCK est normalement polarisée. Lorsque l'on bloque la phosphorylation en substituant la tyrosine avec un acide

aminé hydrophobe de petite taille (alanine) ou aromatique (phénylalanine), l'expression de RhBG est alors dépolarisée.

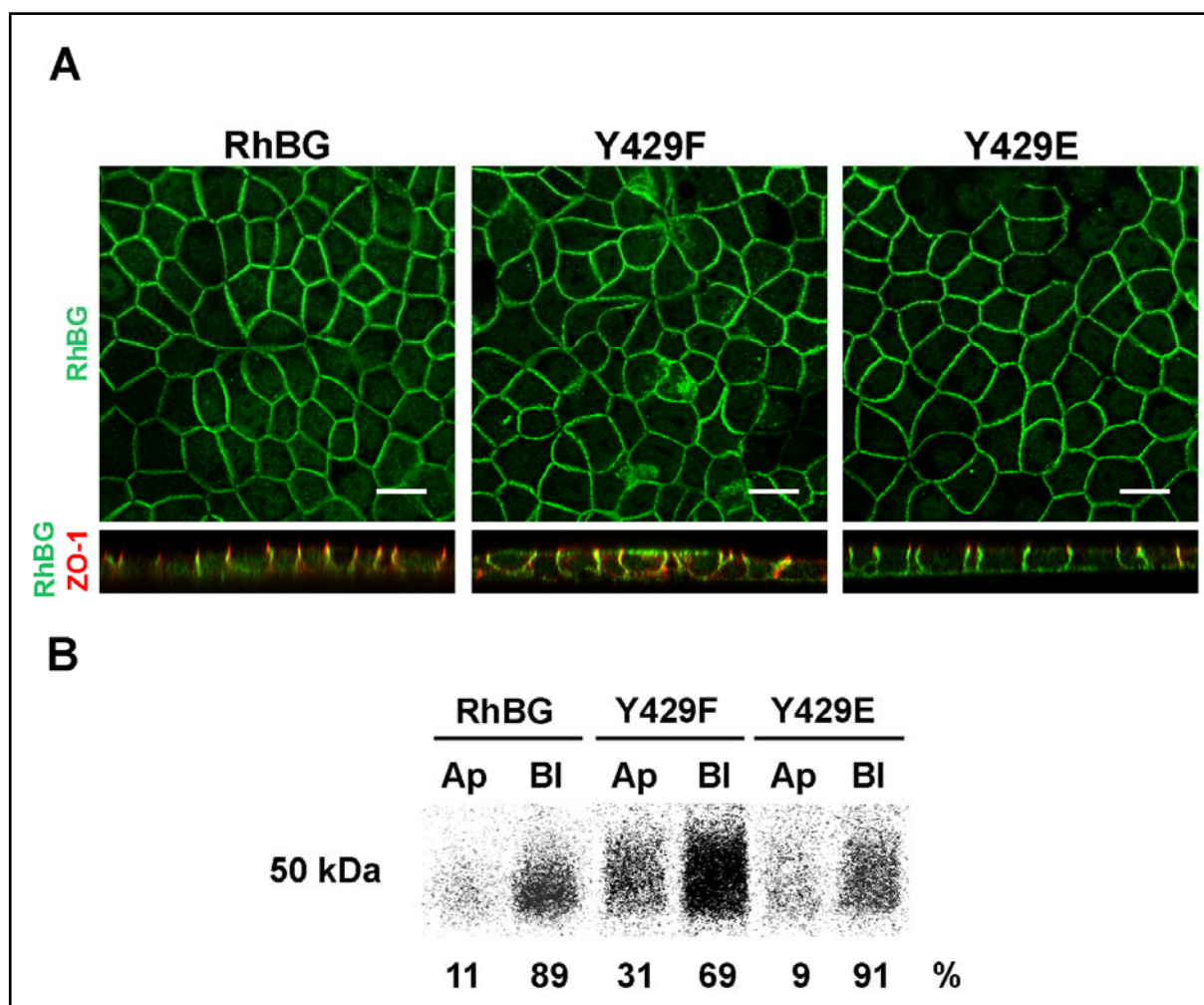


Figure 40. Adressage des mutants Tyr-429 de RhBG dans des cellules MDCK polarisées.

A, Images de microscopie confocale. Des clones de cellules MDCK exprimant la protéine RhBG sauvage (*RhBG*) ou mutée ont été cultivés sur filtre pendant 7 jours puis préparés pour l'analyse par microscopie confocale comme décrit dans la figure 24. Y429A et Y429D (non représentés) présentent la même distribution que les mutants Y429F et Y429E, respectivement. Barre d'échelle, 15 μ m. B, Expression membranaire détectée par biotinylation spécifique de domaines. Des cellules MDCK cultivées sur filtre ont été radiomarquées par addition de méthionine [35 S]/cystéine [35 S] et biotinylées à la membrane apicale (*Ap*) ou basolatérale (*Bl*). Après la lyse, les protéines RhBG totales ont été immunoprécipitées par l'anti-RhBG-Cter, et les protéines biotinylées ont été isolées par des billes d'avidine. Les protéines RhBG biotinylées ont été séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose et autoradiographiées. Les mutants Y429A (*Ap* 35% / *Bl* 65%) et Y429D (*Ap* 8% / *Bl* 92%) (non représentés) présentent une distribution similaire aux mutants Y429F et Y429E, respectivement. Les pourcentages représentent les moyennes de deux expériences indépendantes.

4.2 - Ancrage à la membrane

Notre laboratoire a préalablement montré que la liaison à l'ankyrine G via le motif ⁴¹⁹FLD⁴²¹ était nécessaire à l'ancrage de RhBG à la membrane basolatérale de cellules MDCK polarisées (Lopez *et al.*, 2005). Ce site étant à proximité de la tyrosine Y429, nous avons recherché une implication potentielle de la phosphorylation de cette tyrosine sur l'accrochage de RhBG au squelette dépendant de la spectrine. Des cellules HEK293 ou MDCK polarisées exprimant la protéine RhBG sauvage ou mutée sur la tyrosine Y429 ont été lysées en présence de quantité variable de Triton X-100 et les protéines solubilisées ont été analysées par électrophorèse suivie d'immunoblots (figure 41A et 41B, respectivement).

Le mutant F419A/L420A/D421A qui abolit la liaison à l'ankyrine G (et très probablement l'accrochage au squelette sous-membranaire) a également été analysé comme contrôle. RhBG migre en gel SDS-PAGE en formant deux bandes dont la masse moléculaire apparente est de 50-55 kDa (*Panneaux du haut*), représentant les formes N-glycosylées de la protéine (Liu *et al.*, 2001; Quentin *et al.*, 2003). Les quantités de protéines RhBG solubilisées dans chaque piste ont été normalisées avec les protéines cytoplasmiques endogènes Erk1 et Erk2 (42-44 kDa, *panneaux du bas*). Dans les cellules HEK293 (figure 41A), la protéine RhBG sauvage et le mutant Y429F sont progressivement extraits du squelette avec des concentrations croissantes en détergent pour atteindre un pic à 0,9% et 1% Triton X-100, respectivement. À l'inverse, les mutants Y429E et F419A/L420A/D421A sont solubilisés de façon équivalente entre 0,2% et 1% Triton X-100. Dans les cellules MDCK polarisées (figure 41B), RhBG et Y429F ont été extraits à la plus forte concentration en détergent, et Y429E et F419A/L420A/D421A ont été solubilisés en présence de faibles quantités de Triton X-100 (0,3% et 0,2%, respectivement).

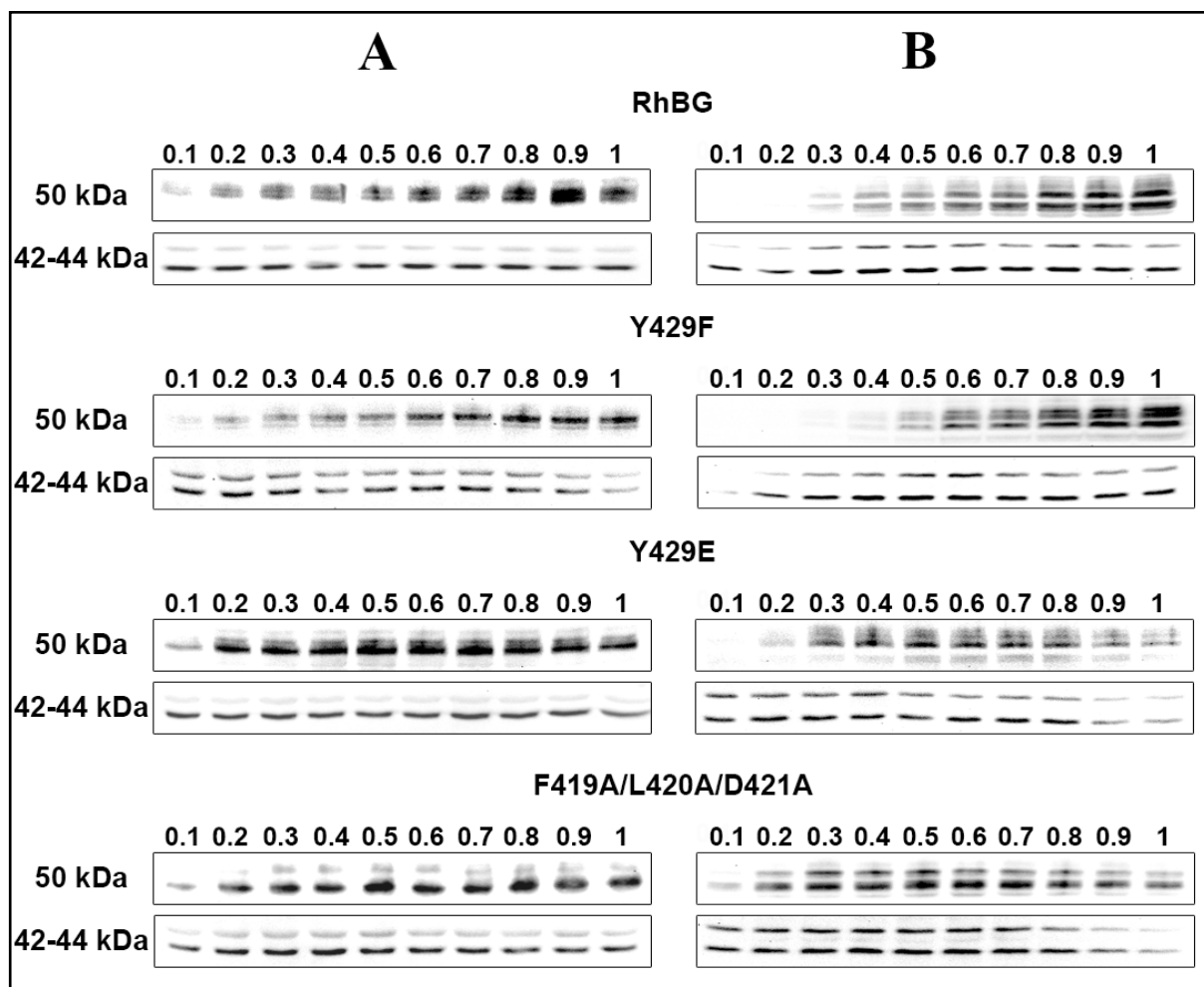


Figure 41. Tests d'extraction au Triton X-100 de RhBG, Y429F, Y429E et F419A/L420A/D421A exprimées dans des cellules HEK293 et MDCK polarisées.

Les cellules HEK293 (A) ou MDCK polarisées (B) exprimant la protéine RhBG sauvage (RhBG) ou mutée ont été lysées en présence de concentration croissante de Triton X-100 comme indiqué (% vol/vol). Les protéines totales extraites ont été analysées par immunoblot. *Panneaux du haut*, les protéines RhBG (50 kDa) ont été révélées par l'ascite anti-RhBG A-08. *Panneaux du bas*, les protéines cytoplasmiques endogènes Erk1 et Erk2.

Ces résultats montrent que le mutant Y429E est solubilisé aussi facilement que le mutant F419A/L420A/D421A dans les deux lignées de cellules HEK293 et MDCK polarisées, et suggèrent que la phosphorylation de la tyrosine Y429 altère l'ancrage de RhBG au squelette dépendant de la spectrine. Il est à noter que le mutant 454Stop dont le motif potentiel de liaison-PDZ est supprimé, ne modifie pas la solubilisation de la protéine RhBG (non représenté).

5 – Adressage et recyclage de la protéine RhBG mutée sur la tyrosine Y429

Pour déterminer l'implication éventuelle de la phosphorylation de la tyrosine Y429 dans d'autres étapes de l'expression de RhBG à la surface cellulaire, nous avons étudié l'adressage et le recyclage de RhBG à la membrane de cellules HEK293 ou MDCK polarisées. Les protéines membranaires ont une demi-vie bien déterminée à la surface cellulaire et la plupart sont endocytosées pour être recyclées dans la cellule. Une partie des protéines endocytosées est dégradée dans la cellule et l'autre partie est réadressée à la membrane. Dans les cellules épithéliales polarisées, on parle de recyclage lorsqu'une protéine membranaire est endocytosée puis réadressée à la membrane. Les protéines apicales peuvent être véhiculées, après endocytose, du pôle basolatéral au pôle apical ; on parle alors de transcytose (figure 42).

Pour cette étude, nous avons associé une expérience de marquage radioactif à une biotinylation des protéines membranaires. L'ensemble des clones cellulaires étudiés exprime des quantités équivalentes de protéines membranaires sauvages ou mutées, déterminées par cytométrie en flux.

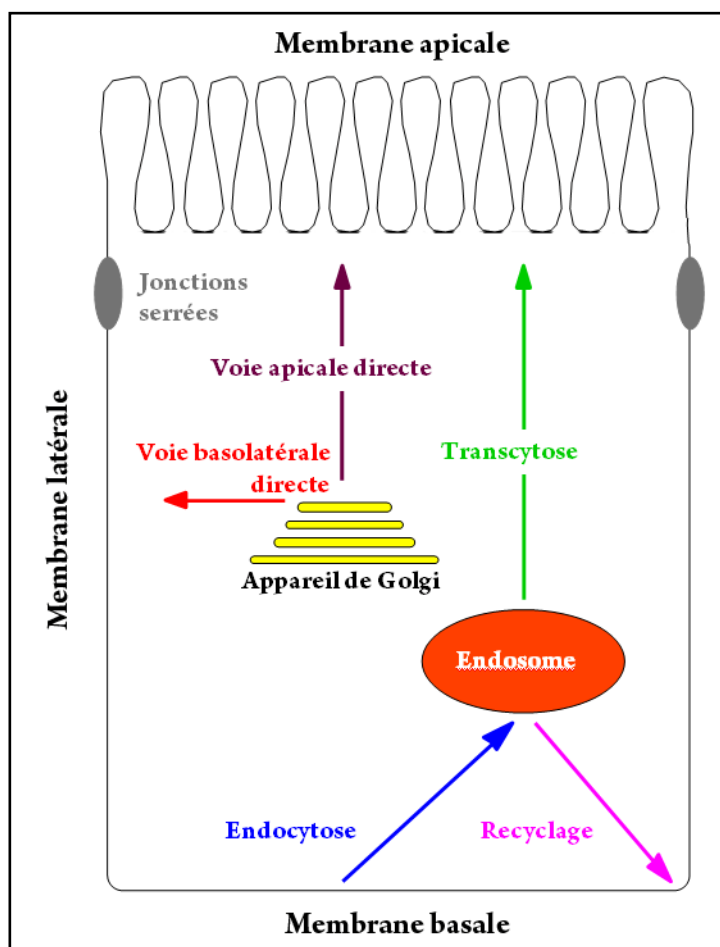


Figure 42. Les voies d'adressage protéique dans les cellules épithéliales polarisées.

Après leur maturation dans l'appareil de Golgi (TGN), les protéines membranaires empruntent l'une et/ou l'autre des deux voies de transport pour atteindre la membrane. Les protéines basolatérales suivent la voie directe de transport entre le TGN et le domaine membranaire basolatéral. Les protéines apicales peuvent soit être adressées directement du TGN au domaine apical, soit transiter au pôle basolatéral où elles sont endocytosées, puis réadressées au domaine apical par transcytose. D'après El Nemer, 2000.

5.1 – Cellules HEK293

Les quantités de protéines radioactives biotinylées sont normalisées par rapport à la quantité de protéines totales biotinylées détectées par immunoblot (figure 43A). Les protéines RhBG nouvellement adressées à la membrane cellulaire après 10 min de radiomarquage atteignent un pic après environ 1,5h de chasse (figures 43A autoradiographies et 43B).

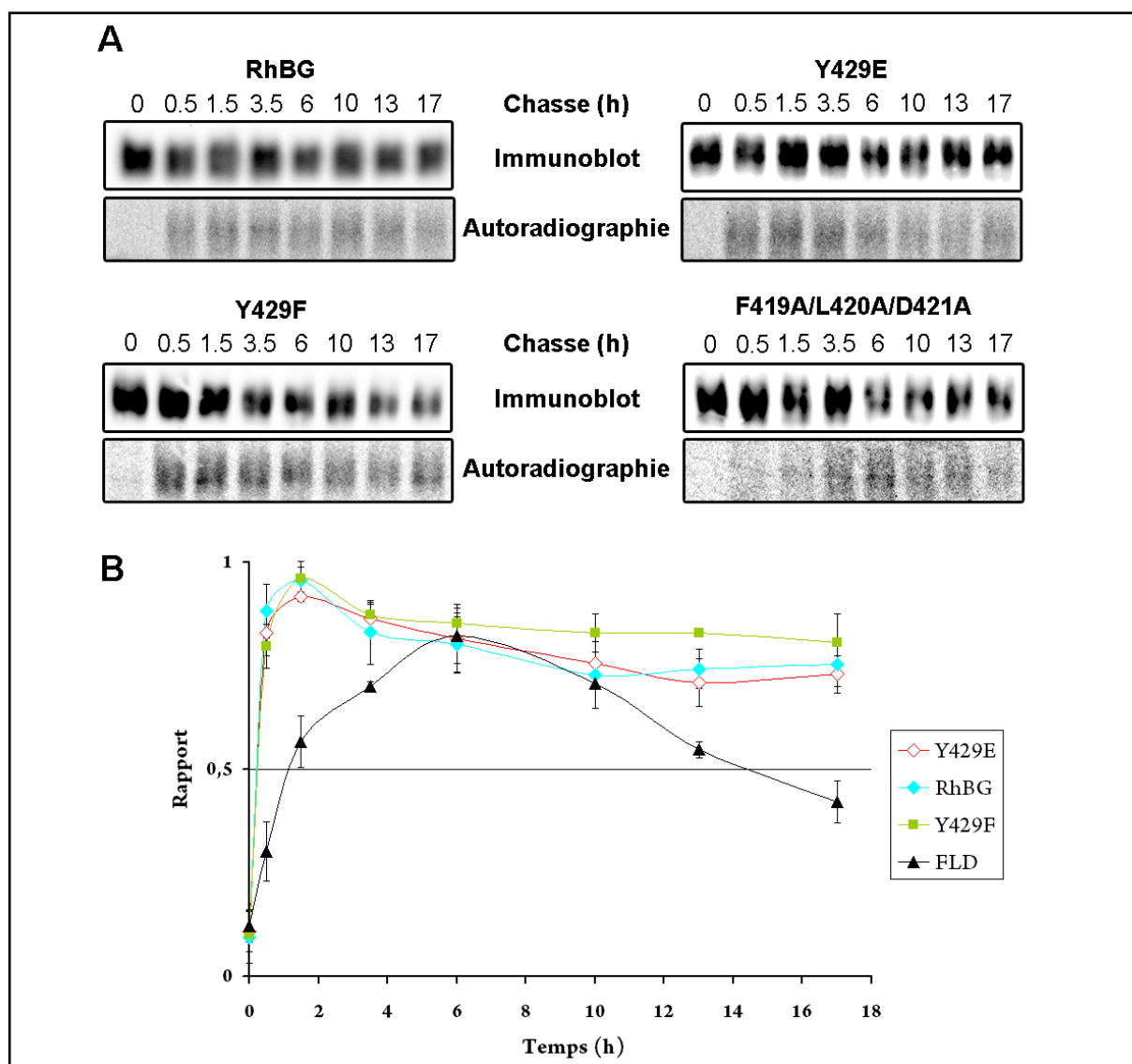


Figure 43. Adressage et recyclage de RhBG, Y429F, Y429E et F419A/L420A/D421A à la surface des cellules HEK293.

Les cellules HEK293 exprimant la protéine RhBG mutée sur la tyrosine Y429 ou sur le site de liaison à l'ankyrine G ont été radiomarquées (méthionine ^{35}S /cystéine ^{35}S) et les protéines membranaires totales ont été biotinylées et immunoprécipitées par l'anticorps anti-RhBG-Cter. A, les protéines RhBG nouvellement adressées à la surface cellulaire sont détectées par autoradiographie des protéines biotinylées. Les quantités totales de protéines RhBG exprimées à la membrane plasmique à chaque temps de chasse ont été déterminées par immunoblot avec l'ascite A-08. B, Les courbes représentent le rapport de RhBG biotinylées radiomarquées/RhBG totales biotinylées à la membrane, reflétant le recyclage des protéines RhBG natives ou mutées nouvellement adressées à la surface cellulaire en fonction du temps. Les courbes représentent les valeurs moyennes de 3 expériences.

Les protéines RhBG présentent une grande stabilité à la membrane plasmique puisque seulement un tiers des protéines est internalisé après un temps de chasse très allongé (17h). Les mutants Y429F et Y429E présentent un profil similaire à la protéine native.

Par conséquent, l'état de phosphorylation de RhBG sur la position 429 n'a aucun effet sur l'adressage et le recyclage de RhBG à la surface des cellules HEK293.

5.2 – Cellules MDCK

La présence du mutant Y429F (et Y429A) aux membranes basolatérale et apicale des cellules MDCK polarisées (figure 40) nous a suggéré d'étudier l'adressage et la stabilité membranaire des protéines aux deux pôles cellulaires dans le but de déterminer si l'adressage de la protéine mutante à la membrane apicale se fait par voie directe ou par transcytose (figure 42). Nous avons donc radiomarqué les cellules MDCK polarisées sur filtre, puis biotinylé sélectivement l'un ou l'autre pôle cellulaire. La présence de protéines membranaires radiomarquées a été révélée par autoradiographie.

Les cellules MDCK polarisées expriment la protéine RhBG sauvage ou mutée à leur surface en quantité moindre par rapport aux cellules HEK293 (MIF_{MDCK} : 170 contre MIF_{HEK293} : 850, soit un rapport de 1/5). Par ailleurs, ces cellules sont cultivées sur filtres Transwell de seulement 12 mm de diamètre alors que les cellules HEK293 le sont dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. De plus, pour les cellules MDCK, nous désirons recueillir deux fractions correspondant à la localisation apicale et basolatérale des protéines, la quantité de protéines présentes dans ces deux échantillons est donc réduite. Ainsi, lorsque l'on marque les cellules au ^{35}S pendant un temps court (30 min), et que l'on suit l'apparition des protéines à la membrane jusqu'à 6h de chasse, le signal en immunoblot sur la fraction de protéines membranaires est très faible et la présence de protéines radioactives est impossible à visualiser. Lorsque ces cellules sont marquées pendant 2h et que l'on suit l'apparition des protéines jusqu'à 24h, les protéines radioactives sont visibles par autoradiographie mais le signal ne diminue jamais, quelque soit le clone étudié.

Par conséquent, il ne nous a pas été possible de déterminer les temps d'adressage et de recyclage des mutants de la tyrosine Y429, lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules MDCK polarisées.

6 – Mutant d'accrochage à l'ankyrine G

Le mutant F419A/L420A/D421A n'étant clairement pas attaché au squelette dépendant de la spectrine dans les cellules HEK293 et MDCK (figure 41), nous avons étudié sa capacité à transporter NH_3 dans les mêmes conditions expérimentales que pour les mutants de phosphorylation (Résultats, partie 2). La cinétique d'augmentation de pH intracellulaire (figure 30) et la constante d'alcalinisation déduite (tableau 5) montrent une inhibition drastique du transport de NH_3 pour le mutant F419A/L420A/D421A comparé aux cellules exprimant la protéine RhBG sauvage ($0,31 \pm 0,087 \text{ s}^{-1}$ contre $1,54 \pm 0,186 \text{ s}^{-1}$).

Tableau 5. Propriétés de la protéine RhBG mutée sur son motif d'accrochage à l'ankyrine G exprimée dans les cellules rénales HEK293.

Cellules	Expression (%) ^a	Constante d'alcalinisation k, s^{-1}	Efficacité de transport (%) ^b
WT ^c	0	$0.27 \pm 0.093 (11)^d$	0
RhBG	100	$1.54 \pm 0.186 (11)$	100
F419A	113	$1.70 \pm 0.228 (3)$	100
L420A	98	$1.25 \pm 0.307 (3)$	79
D421A	115	$1.77 \pm 0.088 (3)$	103
F419A/L420A	70	$0.67 \pm 0.102 (3)$	45
L420A/D421A	105	$0.64 \pm 0.109 (3)$	28
F419A/D421A	68	$1.54 \pm 0.144 (3)$	148
F419A/L420A/D421A	102	$0.31 \pm 0.087 (3)$	3

^a : valeurs relatives à la MIF déterminée pour RhBG

^b : valeurs relatives des constantes d'alcalinisation corrigées pour l'expression membranaire de RhBG et après soustraction de la constante de diffusion passive (WT)

^c : cellules HEK293 sauvages

^d : *n* valeurs entre parenthèses

La valeur relative de la constante corrigée pour l'expression membranaire donne une efficacité de transport de 3% en comparaison avec la protéine RhBG sauvage, résultat comparable aux mutants Y429D et Y429F (5% et 3%, tableau 4). Dans le but de déterminer l'implication de chaque résidu du motif ⁴¹⁹FLD⁴²¹ sur la fonction de transport de NH_3 de RhBG, nous avons créé des simples et doubles mutants alanines (tableau 5). Lorsqu'un seul résidu du motif d'ancrage à l'ankyrine G est muté en alanine, l'efficacité de transport de la protéine n'est pas ou peu affectée (entre 79% et 103%). L'implication de chacun des résidus dans la fonction de transport de NH_3 semble être équivalente. Lorsque l'on mute 2 acides

aminés du site en alanine, la fonction de transport de NH_3 de RhBG peut être fortement diminuée (F419A/L420A et L420A/D421A présentent une efficacité de transport de 45% et 28%, respectivement) voire fortement augmentée (F419A/D421A, 148%). Cette augmentation pourrait être expliquée par un possible changement conformationnel de l'extrémité C-terminale de RhBG qui modifierait l'accessibilité au pore de la protéine et engendrerait un transport plus rapide de l'ammonium. Les effets variables des doubles mutations ne permettent pas de définir clairement l'importance d'un ou plusieurs résidu(s) sur la fonction de RhBG. En conséquence, un motif ⁴¹⁹FLD⁴²¹ de liaison à l'ankyrine G intact est nécessaire à une fonction de transport normale de RhBG dans les cellules HEK293.

Comme pour les mutants de la tyrosine Y429, nous avons ensuite étudié l'adressage et le recyclage à la membrane du mutant F419A/L420A/D421A dans les cellules HEK293 et MDCK polarisées. Dans les cellules MDCK, des problèmes expérimentaux ne nous ont pas permis de déterminer la stabilité et le recyclage membranaire aux deux pôles cellulaires (Résultats, partie 5.2). Dans les cellules HEK293, les protéines F419A/L420A/D421A synthétisées arrivent à la membrane plasmique beaucoup plus lentement que la protéine RhBG et les mutants Y429F/Y429E (6h contre 1,5h) et ce mutant est moins stable puisque sa demi-vie à la surface cellulaire est atteinte après approximativement 15h de chasse (figure 43).

À l'inverse de la mutation de la tyrosine Y429, une inhibition de l'interaction avec l'ankyrine G modifie l'adressage et la stabilité à la surface de la protéine RhBG.

7 – Adressage de la protéine RhBG dans les cellules LLC-PK1 polarisées

Notre laboratoire a mis en évidence, lors d'une étude mutationnelle, le rôle du signal dépendant d'une tyrosine ⁴²⁹YED⁴³¹, localisé dans l'extrémité C-terminale de RhBG, dans la localisation basolatérale de la protéine (Lopez *et al.*, 2005). Les protéines adaptatrices AP-1B ou AP-4 interagissent avec des signaux dépendant d'une tyrosine et peuvent médier l'adressage basolatéral de protéines transmembranaires via leur sous-unité μ 1B ou μ 4, respectivement (Folsch *et al.*, 1999; Simmen *et al.*, 2002). Les cellules LLC-PK1 qui

n'expriment pas la sous-unité $\mu 1B$, adressent par défaut à la membrane apicale les protéines basolatérales qui contiennent un signal dépendant d'une tyrosine interagissant avec $\mu 1B$ (Folsch *et al.*, 1999). Les cellules LLC-PK1 ont été transfectées stablement par le plasmide pcDNA3-RhBG et un pool de cellules exprimant la protéine RhBG a été cultivé sur filtre pour permettre leur polarisation (figure 44).

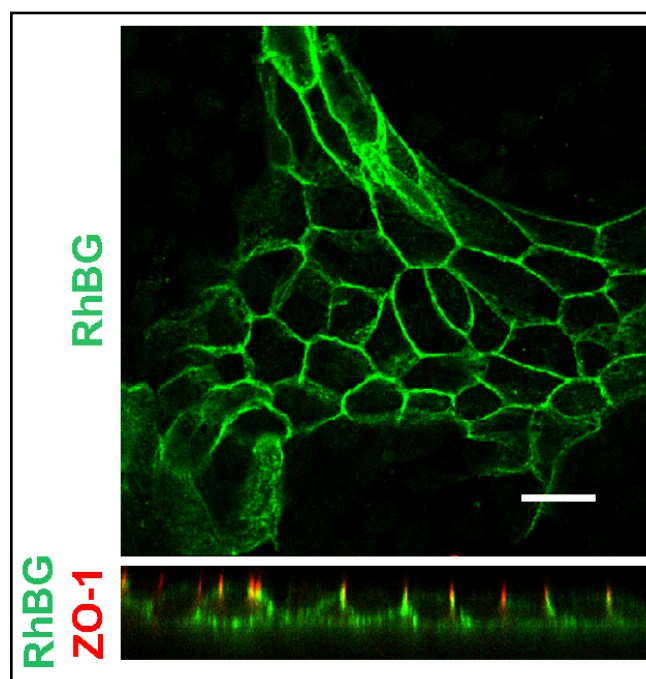


Figure 44. Adressage de RhBG dans les cellules LLC-PK1 polarisées.

Un pool de cellules LLC-PK1 exprimant la protéine RhBG sauvage a été cultivé sur filtre Transwell pendant une semaine puis préparé pour l'analyse par microscopie confocale comme décrit dans la figure 24. Barre d'échelle, 15 μm .

Dans les cellules LLC-PK1 polarisées, l'expression de RhBG (*vert*) est uniquement basolatérale, suggérant que $\mu 1B$ n'est pas nécessaire à l'adressage de la protéine. À ce jour, aucun système cellulaire n'exprimant pas la sous-unité $\mu 4$ est connu, ne nous permettant pas de conclure sur la possible interaction entre RhBG et la protéine adaptatrice AP4. Il n'est pas non plus exclu que d'autres partenaires à ce jour non identifiés puissent diriger la protéine RhBG vers la membrane basolatérale.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, j'ai démontré le rôle crucial de l'extrémité C-terminale de la protéine RhBG sur sa fonction biologique. J'ai montré que la tyrosine Y429, qui appartient au motif YED d'adressage à la membrane basolatérale, était impliquée dans la régulation de l'activité de transport de NH_3 de RhBG. Ce résidu est phosphorylable et l'état de phosphorylation de la protéine RhBG régule négativement son activité de transport, et également son association au squelette dépendant de la spectrine dans des lignées de cellules épithéliales. De même, l'abolition de l'interaction avec l'ankyrine G, inhibe le transport de NH_3 et est corrélée à une diminution très importante de l'accrochage au squelette membranaire. La phosphorylation de la tyrosine Y429 est nécessaire à l'adressage basolatéral de la protéine RhBG dans des cellules MDCK polarisées.

1 – Régulation de la fonction de transport de la protéine RhBG par phosphorylation

Les lignées cellulaires rénales HEK293 et MDCK peuvent être utilisées lors des expériences de spectrophotométrie en flux interrompu, démontrant que le transport de NH_3 n'est pas dépendant d'une lignée cellulaire mais est directement corrélé à l'expression de la protéine RhBG (Zidi-Yahiaoui *et al.*, 2005). Cependant, les cellules HEK293 transfectées par l'ADNc de RhBG, présentent des niveaux d'expression et des activités de transport plus élevés de la protéine RhBG que les cellules MDCK recombinantes et représentent ainsi un modèle plus précis pour la comparaison des différents mutants de cette étude.

Des 4 sites potentiellement phosphorylables localisés dans l'extrémité C-terminale de la protéine RhBG, seule la tyrosine Y429 a un effet négatif drastique sur le transport de NH_3 lorsqu'elle est mutée en acide aspartique ou en acide glutamique, mimant ainsi une phosphorylation constitutive. L'ensemble des autres mutants présente une réduction de leur capacité de transport très modérée, entre 3% et 34% en comparaison de la protéine RhBG native. De plus, cette faible diminution de l'activité est équivalente, que les sérines S422, S426

ou la thréonine T456 soient mutées en alanine ou en acide aspartique, suggérant fortement que la phosphorylation de ces résidus, si elle existe, ne modulerait pas la fonction de RhBG.

L'analyse *in silico* de l'extrémité C-terminale de RhBG a mis en évidence les sérines S422 et S426 comme site(s) potentiellement phosphorylable(s). Cela nous a conduits à étudier la phosphorylation de ces résidus par les kinases purifiées Caséine Kinases CKI et CKII. Bien que la thréonine T456 présente un score de prédiction de phosphorylation très faible, il s'est avéré qu'elle était le seul résidu reconnu spécifiquement par ces kinases. Les sérines S422 et S426, ainsi que la thréonine T456 n'ayant pas une influence significative sur l'efficacité de transport de NH_3 de RhBG, nous n'avons pas poursuivi nos investigations sur la phosphorylation de ces acides aminés. Il sera tout de même important de confirmer que la thréonine T456, faisant partie du possible motif de liaison-PDZ DTQA (Introduction, figure 26), est un site phosphorylable et d'en déterminer le rôle éventuel : régulation d'une interaction avec un partenaire protéique à ce jour inconnue et/ou de l'adressage/la stabilité de la protéine RhBG à la membrane plasmique (Discussion, page 127).

À l'inverse de ces 3 résidus, la tyrosine Y429 semble jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la fonction de transport de la protéine RhBG. Ainsi, nous avons étudié plus en détails la phosphorylation de ce résidu et montré qu'il était phosphorylable d'une part dans des bactéries TKB1 et d'autre part *in vitro* par les kinases purifiées Src et Syk. La tyrosine Y429 fait partie du signal d'adressage dépendant d'une tyrosine YED. Ces signaux ressemblent aux domaines de liaison SH2 (Src-Homology 2) spécifiques de nombreuses kinases, en particulier les familles Src et Syk. Ces domaines SH2 sont des domaines globulaires de protéines, d'environ 100 acides aminés, qui médient un nombre important de processus intracellulaires via une interaction avec des motifs contenant une phosphotyrosine (Pawson *et al.*, 2001). Les signaux dépendants d'une tyrosine jouent un rôle dans les mécanismes d'adressage et lorsque la tyrosine est phosphorylée, dans des voies de signalisation intracellulaire (Stephens and Banting, 1997; Wu *et al.*, 2003). De nombreux exemples de régulation de l'activité de canaux membranaires par phosphorylation sur tyrosine existent. Par exemple, la phosphorylation par des Src kinases peut soit activer les canaux TRPC4 (Transient Receptor Potential Channel) (Odell *et al.*, 2005) et TRPC6 (Hisatsune *et al.*, 2004), soit inhiber les canaux calciques

VDCC (Voltage-Dependent Ca^{2+} Channels) (Vela *et al.*, 2007) et les canaux potassiques ROMK (Renal Outer Medullary K) (Lin *et al.*, 2008).

Le traitement par le pervanadate de cellules HEK293 exprimant la protéine RhBG induit une inhibition de l'efficacité de transport de NH_3 de 60%. Cette réduction limitée de l'activité, en comparaison des 95% et 97% d'inhibition pour les mutants Y429D et Y429E, est probablement due à un équilibre de protéines RhBG phosphorylées/déphosphorylées à la surface des cellules traitées par le pervanadate, alors que la totalité des protéines Y429D/E miment une phosphorylation constitutive. Il est à noter que 4 tyrosines sont également présentes dans les première, troisième et cinquième boucles intracellulaires de la protéine ((Huang and Liu, 2001; Liu *et al.*, 2001) et figure 37). L'absence d'inhibition de transport dans le mutant Y429A incubé avec le pervanadate démontre ainsi que la tyrosine Y429 est le seul résidu tyrosine à être impliqué dans la régulation du transport de NH_3 via une phosphorylation sensible au pervanadate. De plus, ces résultats indiquent que la protéine RhBG est effectivement phosphorylée *ex vivo* sur la tyrosine Y429.

Il ne m'a pas été possible de visualiser la protéine RhBG phosphorylée *ex vivo* par des méthodes biochimiques directes (marquage au ^{32}P , anticorps antiphosphopeptide) (Résultats, partie 3.2). Il serait intéressant de le montrer, car il est possible que le NH_3 joue un rôle crucial dans l'état de phosphorylation de la protéine RhBG, comme cela se déroule pour les protéines AmtS et Meps. En effet, ces protéines jouent un rôle de senseur de l'état de l'ammonium extracellulaire et sont impliquées dans des voies de signalisation. Chez la levure, Mep2 peut favoriser la croissance filamenteuse lorsque l'apport en ammonium extracellulaire est faible (Lorenz and Heitman, 1998; Javelle *et al.*, 2003; Biswas and Morschhauser, 2005), alors que chez *E. coli*, l'AmtB peut inhiber la transcription des gènes régulés par l'azote lorsque la quantité d'ammonium extracellulaire est trop importante (Javelle *et al.*, 2004). Il est possible qu'un phénomène similaire puisse se passer chez l'Homme : la concentration en $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ influencerait directement l'état de phosphorylation de la protéine RhBG qui, pour de fortes quantités d'ammonium, pourrait être déphosphorylée à la membrane basolatérale des cellules épithéliales et permettre le transport de NH_3 .

2 – Régulation de la fonction de transport, de l'adressage et de la stabilité membranaire de la protéine RhBG par son interaction avec l'ankyrine G

Le mutant F419A/L420A/D421A de la protéine RhBG abolissant l'accrochage à l'ankyrine G présente également une inhibition très importante (93%) de l'activité de transport de NH_3 dans les cellules HEK293. L'étude d'une mutation associée à une arythmie cardiaque dominante appelée le syndrome de Brugada, où la modification d'un seul acide aminé dans une boucle intracellulaire du canal sodique cardiaque Nav1.5 (E1053K) abolit son interaction avec l'ankyrine G, montre des propriétés fonctionnelles altérées du canal lorsque ce mutant est exprimé dans des cellules HEK293 (Mohler *et al.*, 2004a). De même, l'ankyrine G peut moduler les propriétés d'ouverture du canal sodique neuronal Nav1.6 dans des cellules tsA201 qui dérivent des cellules HEK293 (Shirahata *et al.*, 2006). Dans ce travail, j'ai montré pour la première fois qu'une mutation abolissant une interaction avec l'ankyrine G entraînait l'inactivation d'un canal à gaz dans des cellules épithéliales rénales. Récemment, il a été démontré que dans des cardiomyocytes exprimant de façon réduite l'ankyrine G, les canaux Nav1.5 résiduels localisés à la membrane plasmique avait des propriétés biophysiques normales, soulignant l'importance d'étudier des interactions protéines membranaires/ankyrine dans un contexte physiologique de cellules natives (Lowe *et al.*, 2008). Bien que nous ayons étudié la fonction de la protéine RhBG humaine dans des cellules épithéliales rénales humaines, de nouvelles mesures de transport de NH_3 dans une lignée cellulaire originaire de tubule connecteur ou de canal collecteur, dans laquelle RhBG est exprimée (Quentin *et al.*, 2003; Verlander *et al.*, 2003), devrait clarifier cette question.

Les mutants de phosphorylation Y429D/E et d'accrochage à l'ankyrine G F419A/L420A/D421A ne sont pas fonctionnels bien qu'ils soient exprimés à la surface des cellules HEK293. Cependant, leur comportement lors des expériences d'adressage membranaire est différent. En effet, alors que le mutant Y429E présente le même profil d'adressage et de recyclage membranaire que la protéine RhBG native, le mutant F419A/L420A/D421A atteint la surface cellulaire avec un retard de 4,5h (6h par opposition à 1,5h), et est internalisé plus rapidement. Ces résultats suggèrent que l'ankyrine G pourrait être

impliquée dans l'adressage et le recyclage de la protéine RhBG à la membrane plasmique des cellules HEK293, et une inhibition de l'interaction de ces deux protéines pourrait ralentir l'adressage membranaire de RhBG et diminuer sa stabilité.

De nombreuses études ont été faites concernant l'importance des ankyrines pour l'adressage et la stabilité de leurs partenaires protéiques membranaires :

- l'interaction entre les protéines Rh, RhAG et l'ankyrine R est indispensable pour la biosynthèse et/ou la stabilité du complexe Rh à la membrane des GRs (figure 45A). Des travaux dans notre laboratoire ont montré que l'abolition de l'interaction aboutissait à une anomalie morphologique des GRs (Nicolas *et al.*, 2003).

- dans les neurones, l'ankyrine G est nécessaire à l'expression membranaire du canal sodique dépendant du voltage (Nav1.6) (Pan *et al.*, 2006), des canaux potassiques KCNQ2/3 (Chung *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2006) et de la neurofascine, un membre de la famille L1-CAM (L1/Cell Adhesion Molecule, molécules d'adhérence cellulaire) (Davis *et al.*, 1996), dans des microdomaines spécialisés (figure 45B). De plus, des mutations dans le motif d'interaction des protéines de la famille des L1-CAM aux ankyrines B et G sont responsables d'une maladie neurologique récessive liée au chromosome X : la maladie CRASH (Corpus callosum agenesis, Retardation, Aphasia, Spastic paraplegia, Hydrocephalus) qui peut entraîner des hydrocéphalies, des retards mentaux et une hypoplasie, voire une absence du tractus corticospinal et du corps calleux (Fransen *et al.*, 1995).

- dans les cellules épithéliales, il a été démontré d'une part que l'ankyrine G et la spectrine β II collaboraient pour former la membrane latérale de cellules épithéliales bronchiques (Kizhatil and Bennett, 2004; Kizhatil *et al.*, 2007b) et d'autre part que l'ankyrine G était indispensable pour une sortie efficace de l'appareil de Golgi de l'E-cadherine (Kizhatil *et al.*, 2007a), une molécule d'adhérence cellulaire qui est ubiquitaire dans les membranes latérales des tissus épithéliaux, mais également de la Na⁺/K⁺ ATPase (Devarajan *et al.*, 1997) (figure 45C).

- dans les tubules transversaux (tubules T) de cardiomyocytes, l'ankyrine B est indispensable pour la formation de microdomaines membranaires spécialisés comprenant la Na^+/K^+ ATPase, un échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) et le récepteur à Inositol triphosphate (InsP3R) (Mohler *et al.*, 2005) (figure 45D). L'ankyrine G, également présente dans les cardiomyocytes, interagit avec le transporteur à sodium Nav1.5 et régule via cette association, l'adressage de Nav1.5 (Lowe *et al.*, 2008). Chez l'Homme, des mutations perte de fonction de ANK2 causent une arythmie cardiaque avec des risques augmentés de mort cardiaque subite induite par un stress (Mohler *et al.*, 2003; Mohler *et al.*, 2004b)

Enfin, une étude précédente de notre laboratoire avait montré que la localisation de RhBG dans des cellules MDCK polarisées était uniquement cytoplasmique lorsque l'interaction avec l'ankyrine G était inhibée ((Lopez *et al.*, 2005) et Introduction, figure 25). Nous aurions pu regarder de manière plus précise la localisation intracytoplasmique (appareil de Golgi, Réticulum Endoplasmique...) du mutant par immunofluorescence pour déterminer l'organe dans lequel il est retardé. Il aurait été intéressant de pouvoir étudier l'adressage et le recyclage de RhBG également dans des cellules MDCK polarisées, mais il ne m'a pas été possible de le faire du fait de la faible expression de RhBG à la membrane de ces cellules.

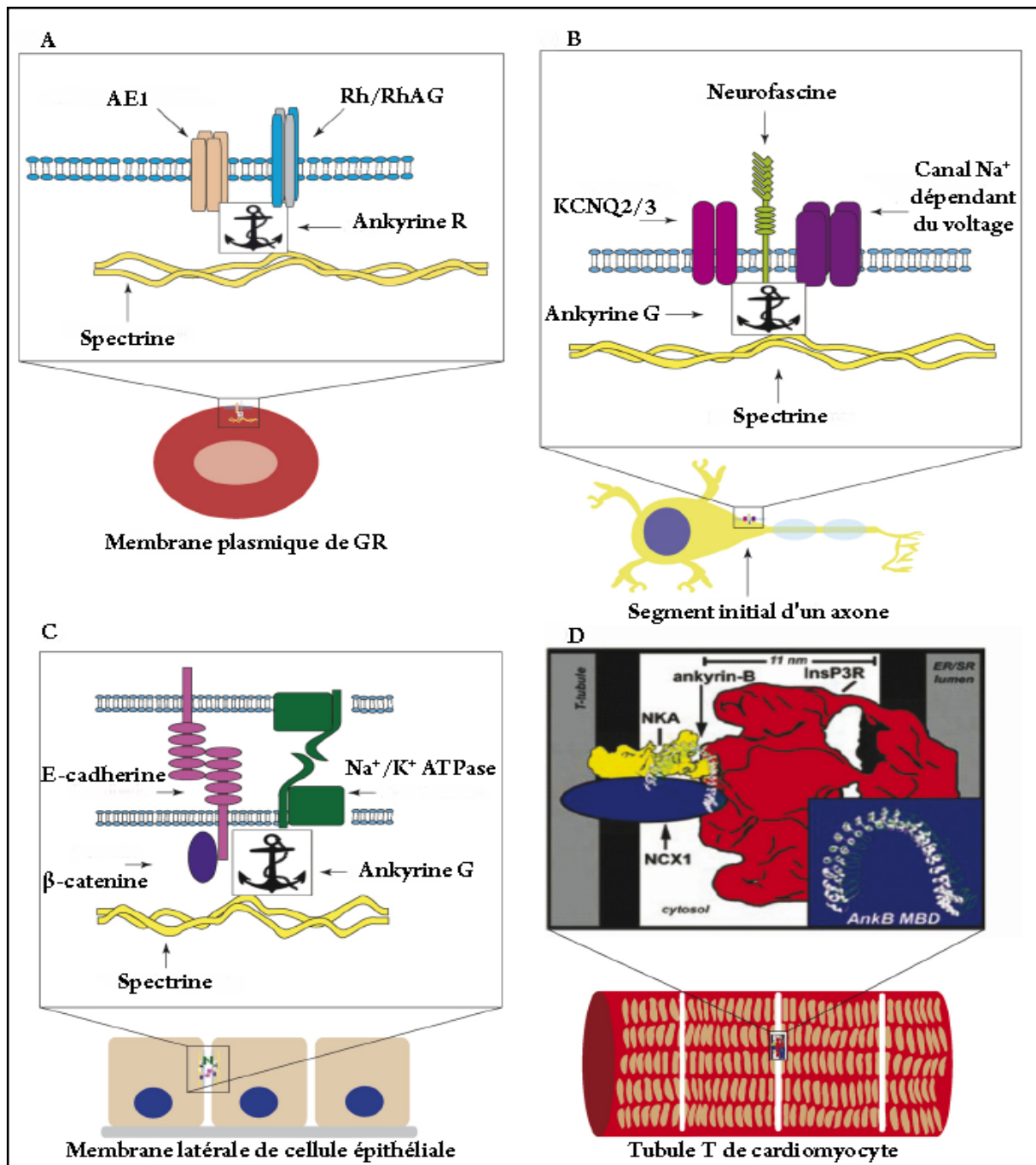


Figure 45. L'ankyrine et la spectrine organisent des complexes macromoléculaires dans divers types de cellules spécialisées.

A, L'ankyrine R associe l'AE1 et les protéines Rh et RhAG au squelette membranaire dépendant de la spectrine. B, L'ankyrine G forme un complexe avec la spectrine β IV, la neurofascin et des canaux ioniques (KCNQ2/3 et le canal sodique dépendant du voltage) dans les segments initiaux des axones des cellules de Purkinje. C, L'ankyrine G interagit avec l'E-cadherine, la spectrine β II et la Na⁺/K⁺ ATPase à la membrane latérale de cellules épithéliales. D, Dans les cardiomyocytes, l'ankyrine B est associée à la Na⁺/K⁺ ATPase, l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ (NCX1) et le récepteur d'inositol triphosphate (InsP3R) dans les tubules transversaux (tubules T). D'après Bennett and Healy, 2008.

Dans des cellules non polarisées, bien que le mutant d'accrochage à l'ankyrine G s'exprime à la membrane plasmique, il n'est pas associé au squelette membranaire. Différents signaux ou différentes hiérarchies de signaux localisés dans la protéine RhBG pourraient être impliqués dans son adressage et son expression membranaire, selon que les cellules sont polarisées ou non. Cette hypothèse a été préalablement évoquée lors d'une étude de l'AE1 rénal (kAE1) (Toye *et al.*, 2004) : les 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de kAE1 contiennent vraisemblablement un motif d'adressage à la membrane plasmique (qui intervient dans des cellules MDCK non polarisées) et un motif YDEV d'adressage et/ou de rétention à la membrane basolatérale (intervenant dans des cellules MDCK polarisées). En absence de ces résidus, la protéine mutée est majoritairement internalisée dans des cellules non polarisées et est exprimée à la membrane apicale dans des cellules polarisées. Ces résultats pourraient être expliqués par la présence de signaux cryptiques dans la protéine kAE1 normale, qui deviendraient dominants dans la protéine kAE1 mutée.

3 - Régulation de l'accrochage de la protéine RhBG au squelette sous-membranaire par phosphorylation de la tyrosine Y429

Les mutants Y429E et Y429F sont normalement adressés à la surface des cellules HEK293, probablement parce qu'ils interagissent toujours avec l'ankyrine G. Cependant, le mutant Y429F est associé au squelette dépendant de la spectrine aussi fortement que la protéine RhBG native, alors que le mutant Y429E est solubilisé dans les mêmes conditions (faible concentration en Triton X-100) que le mutant F419A/L420A/D421A. Ce résultat est inattendu puisque les expériences de demi-vie à la membrane montrent que les cinétiques d'adressage et de recyclage des mutants Y429E et F419A/L420A/D421A sont clairement différentes. Nous proposons que l'état de phosphorylation de la tyrosine Y429 n'influence pas l'adressage membranaire de RhBG mais lorsque la protéine est phosphorylée, l'accrochage au squelette sous-membranaire est altéré, entraînant une inhibition du transport de NH₃, comme pour le mutant qui n'interagit plus avec l'ankyrine G (mutant F419A/L420A/D421A).

Dans des cellules MDCK polarisées, les mutants Y429A/F sont exprimés aux deux domaines apical et basolatéral parce que le motif d'adressage à la membrane basolatérale (Introduction, figure 26) est muté. Les mutants Y429D/E sont exclusivement exprimés au domaine basolatéral de ces cellules, comme la protéine RhBG native. La localisation du mutant F419A/L420A/D421A est exclusivement intracellulaire (Introduction, figure 25).

Les expériences de solubilisation (Résultats, figure 41) révèlent des profils d'extraction similaires entre les cellules MDCK polarisées et les cellules HEK293 : le mutant Y429F est fortement lié au squelette comme la protéine RhBG native, alors que les mutants Y429E et F419A/L420A/D421A n'y sont pas accrochés. Ces résultats corroborent notre hypothèse d'une expression de RhBG, à la membrane plasmique de cellules non polarisées, indépendante de la phosphorylation sur la tyrosine Y429. Pour un adressage basolatéral correct de la protéine dans des cellules polarisées, le résidu Y429 doit être phosphorylé. De plus, comme dans les cellules HEK293, la protéine RhBG phosphorylée n'est pas ou peu liée au squelette sous-membranaire de cellules MDCK polarisées. Des études précédentes ont rapporté que la liaison à l'ankyrine B permettait aux protéines de la famille L1-CAM d'avoir une activité d'adhérence homophile et réduisait leur mobilité dans la membrane plasmique (Nagaraj and Hortsch, 2006), alors que la phosphorylation (dépendante de la voie Map Kinase) de la tyrosine du motif FIGQY localisé dans l'extrémité C-terminale intracytoplasmique de ces molécules d'adhérence, inhibait la liaison à l'ankyrine et permettait ainsi l'induction de la croissance neuronale (Garver *et al.*, 1997; Tuvia *et al.*, 1997; Whittard *et al.*, 2006). Une autre étude démontrait que l'association entre les sous-unités $\beta 1$ du canal à Na^+ et l'ankyrine G était médiée par une séquence de 16 acides aminés présente dans le domaine intracellulaire de $\beta 1$ et que la phosphorylation d'un résidu tyrosine localisé à l'extrémité de ce motif abolissait la liaison à l'ankyrine (Malhotra *et al.*, 2002). La rupture de cette interaction permet à $\beta 1$ d'être adressée vers d'autres domaines cellulaires où elle interagirait avec différentes molécules d'adhérence, du cytosquelette et de signalisation (Malhotra *et al.*, 2004).

La tyrosine Y429 de la protéine RhBG est distante de 7 acides aminés du motif FLD d'interaction avec l'ankyrine G (Introduction, figure 26), cependant son état de phosphorylation pourrait réguler la liaison entre ces deux protéines par un mécanisme qui reste à élucider, mais qui pourrait être un changement conformationnel de la protéine RhBG.

En effet, la structure cristallographique d'une protéine *Rh-like* présente chez *N. europaea* montre une extrémité C-terminale en hélice α qui suggère qu'un partenaire protéique pourrait réguler l'ouverture du canal via son interaction avec la protéine *Rh-like* (Li *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'obtenir un cristal d'une des glycoprotéines Rh, pour déterminer d'une part la nature exacte du substrat transporté (NH_3 ou NH_4^+ , voire le CO_2), et d'autre part le mécanisme de régulation de la fonction de la protéine RhBG lors de sa phosphorylation et de son interaction avec l'ankyrine G. Cette étude a par ailleurs débuté dans notre laboratoire sur la glycoprotéine RhCG.

Un moyen de savoir si l'état de phosphorylation de la protéine RhBG agit directement sur la fonction de transport de NH_3 ou au travers de son interaction avec l'ankyrine G, serait d'étudier les propriétés de transport d'ammonium de la protéine RhBG native ou mutée sur la tyrosine Y429 dans des cellules dépourvues d'ankyrine G, grâce à l'utilisation d'un siRNA spécifique de l'ankyrine G. Cependant, cette approche ne pourra se faire que dans des cellules épithéliales non polarisées de type HEK293, puisqu'il a été montré que la déplétion d'ankyrine G dans des cellules épithéliales bronchiques a un effet drastique sur le phénotype cellulaire avec, entre autres, une perte de la membrane basolatérale (Kizhatil *et al.*, 2007b).

Par ailleurs, nous réaliserons en collaboration avec le Dr C. Etchebest (Unité INSERM UMRS 726, Paris) un modèle *in silico* de la protéine RhBG, associée ou non à l'ankyrine G, pour comprendre précisément le rôle de cette interaction sur la conformation tridimensionnelle de RhBG.

Le mutant 454Stop ne présente pas de modification significative de l'efficacité de transport de NH_3 et est adressé normalement à la membrane où il est correctement accroché au squelette dépendant de la spectrine. Une étude plus détaillée devrait préciser si le motif C-terminal DTQA peut s'associer à une protéine PDZ et s'il intervient dans une voie d'adressage spécifique. En effet, le domaine de liaison à une protéine PDZ de la protéine KAE1 pourrait être impliqué dans l'adressage par voie directe à la membrane plasmique, alors que le signal dépendant d'une tyrosine YDEV pourrait fonctionner comme un motif de recyclage basolatéral/endosomal (Toye, 2005).

4 - Modèle de régulation de l'adressage et de la fonction de la protéine RhBG

En considérant l'ensemble de ces résultats, nous proposons un modèle de régulation de l'adressage et de la fonction de la protéine RhBG par son extrémité C-terminale. Dans des cellules non polarisées, RhBG est adressée à la membrane plasmique grâce à son interaction avec l'ankyrine G, l'état de phosphorylation de la tyrosine Y429 de RhBG n'intervenant pas. Une fois à la membrane, RhBG doit être dans un état déphosphorylée pour s'associer au squelette dépendant de la spectrine via l'ankyrine G et devenir fonctionnelle pour le transport de NH_3 . Dans des cellules épithéliales polarisées, c'est-à-dire dans des conditions plus physiologiques, la phosphorylation de la tyrosine Y429 du signal YED est indispensable à l'adressage basolatéral de RhBG. Comme dans les cellules non polarisées, la déphosphorylation de la tyrosine permet l'ancrage de la protéine au squelette sous-membranaire via l'ankyrine G, mais également l'activation du canal NH_3 (figure 46).

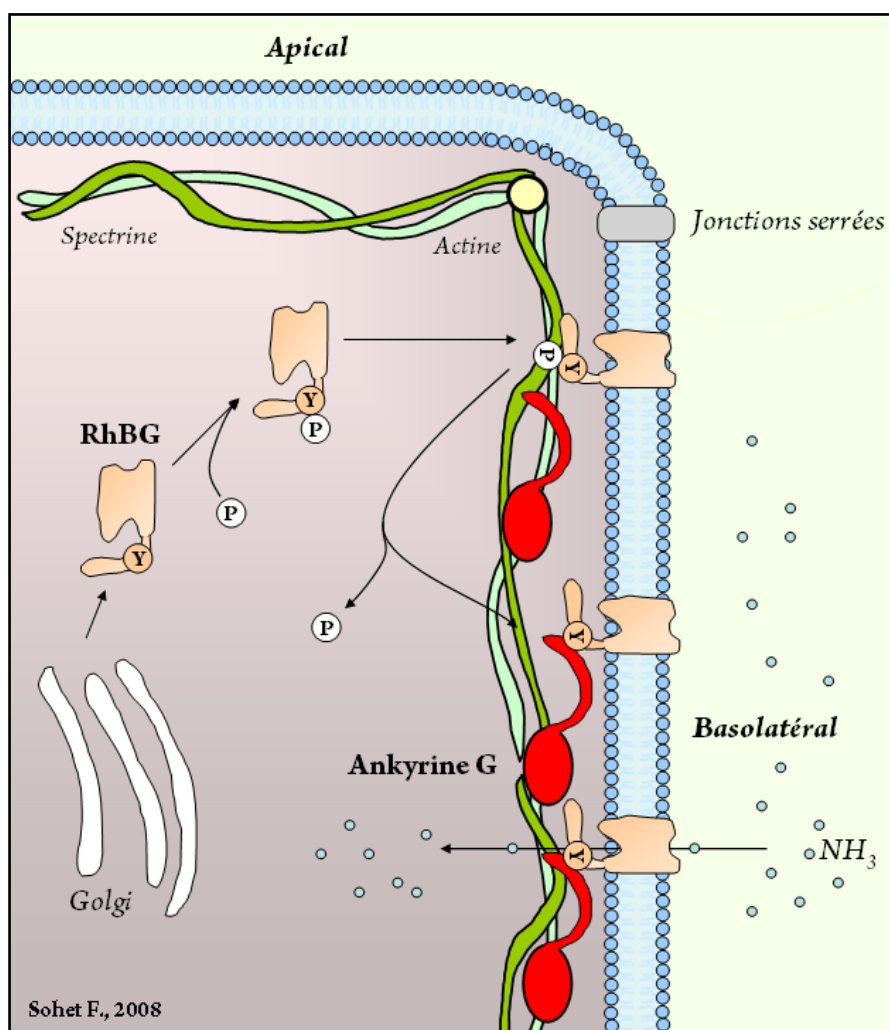


Figure 46. Modèle de régulation de l'adressage et de la fonction de la protéine RhBG par son extrémité C-terminale dans des cellules épithéliales polarisées.

Un mécanisme similaire de régulation de l'adressage de kAE1 par phosphorylation de la tyrosine C-terminale a été proposé (Toye, 2005). Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a aucune preuve montrant une interaction entre kAE1 et l'ankyrine G dans le rein, bien qu'une interaction entre l'AE1 érythrocytaire et l'ankyrine R a été décrite (Bennett and Baines, 2001). Un macrocomplexe Rh/RhAG/AE1/ankyrine R à la surface des GRs a été mis en évidence (Bruce *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2003). Il a été proposé que ce macrocomplexe formerait un métabolon qui, dans l'hypothèse où RhAG transporterait du CO₂, régulerait rapidement le passage d'ions et/ou de gaz à travers la membrane du GR (Bruce *et al.*, 2003). La sortie d'O₂ et l'entrée de CO₂ dans les GRs doivent être réalisées dans un temps limité lors de leur passage à

proximité des cellules endothéliales. Le métabolon Rh/RhAG/AE1/ankyrine R permettrait cet échange rapide.

Nous pouvons également supposer l'existence d'un macrocomplexe similaire, RhBG/kAE1/ankyrine G, à la membrane plasmique des cellules épithéliales rénales (Lopez *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2006). Ce métabolon pourrait ainsi réguler rapidement et efficacement le pH sanguin en favorisant l'excrétion de NH_3 et de protons dans l'urine (Introduction, partie 2.3.2 et figure 17). Par conséquent il serait intéressant de déterminer si kAE1 et l'ankyrine G sont effectivement des partenaires, et s'ils le sont, d'étudier la régulation de l'activité de kAE1 par son accrochage à l'ankyrine G (figure 47). Ce serait un argument supplémentaire en faveur de l'importance des ankyrines dans l'organisation de macrocomplexes contenant plusieurs canaux ou transporteurs, comme cela a été précédemment proposé pour l'ankyrine G dans les segments initiaux des axones (Jenkins and Bennett, 2001) et pour l'ankyrine B dans les cardiomyocytes (Mohler *et al.*, 2005).

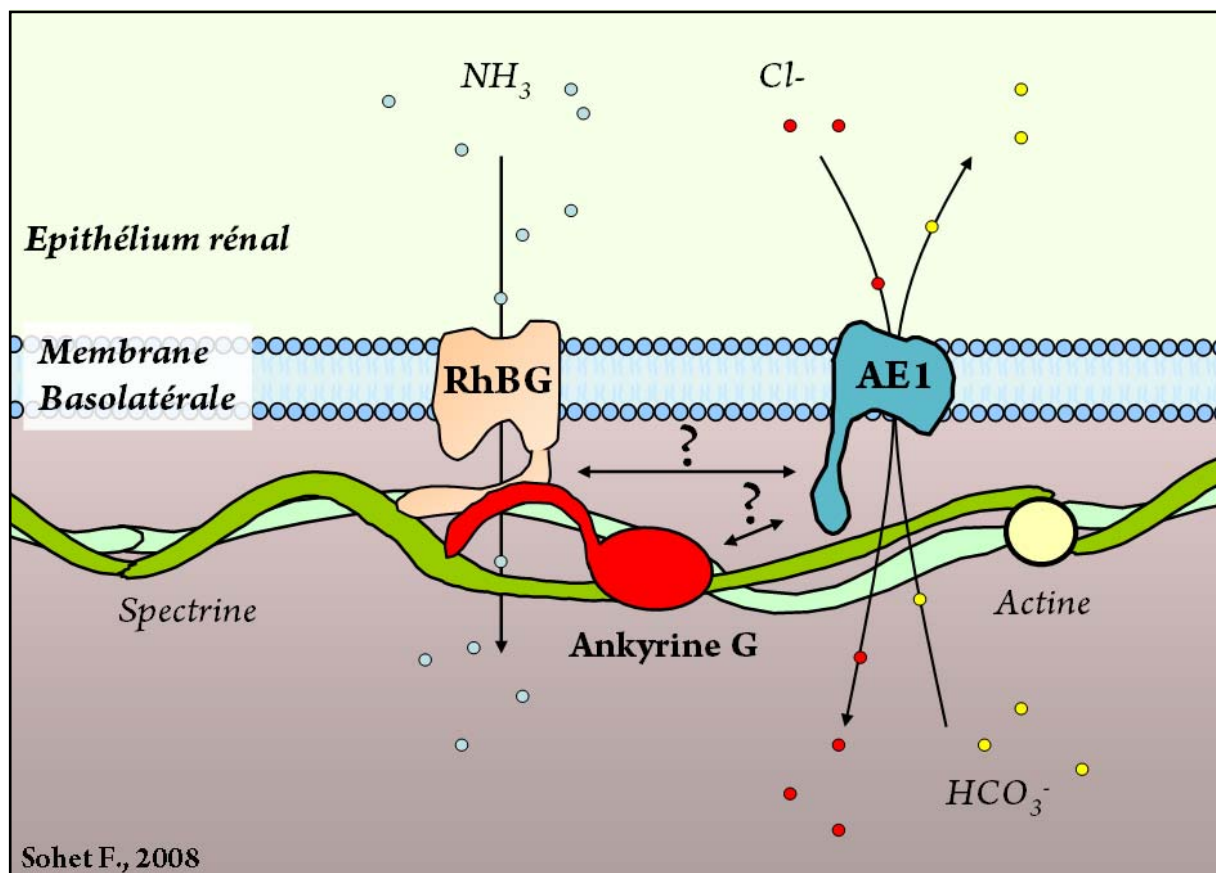


Figure 47. Schéma de la membrane basolatérale d'une cellule épithéliale.

Les protéines RhBG, kAE1 et l'ankyrine G interagissent-elles entre elles pour réguler leur adressage et/ou leur fonction ?

5 - Régulation allostérique de la fonction des glycoprotéines Rh ?

Des travaux très récents ont montré que l'extrémité C-terminale des transporteurs d'ammonium Meps chez la levure (Marini *et al.*, 2000b) et chez des végétaux AtAMT1;1 (Loque *et al.*, 2007) et AtAMT1;2 (Neuhauser *et al.*, 2007) jouait un rôle de régulateur allostérique essentiel à leur fonction, par son interaction avec des boucles cytosoliques, à la fois dans le même monomère et avec le monomère adjacent de la protéine, conduisant à des changements conformationnels du complexe trimérique. La phosphorylation de résidus conservés dans le Cter en serait le mécanisme. Dans l'hypothèse où les glycoprotéines Rh sont présentes sous forme trimérique à la surface cellulaire (Li *et al.*, 2007; Lupo *et al.*, 2007), il serait envisageable qu'elles soient également régulées de façon allostérique. Nous étudierons ainsi l'effet sur le transport de NH_3 de la coexpression de deux protéines RhBG, l'une mutée ou non sur la tyrosine Y429 et l'autre, sauvage ou mutée dans le pore.

6 - Autre(s) fonction(s) potentielle de la protéine RhBG

L'invalidation du gène *Rhbg* chez la souris ne perturbe vraisemblablement pas l'excrétion rénale de NH_4^+ et le recyclage hépatique du NH_4^+ plasmatique (Introduction, partie 2.3.5 et (Chambrey *et al.*, 2005)). Cette absence d'effet pourrait être expliquée soit par un phénomène de compensation du transport d'ammonium par d'autres protéines membranaires (AQPs ou Rhcg), soit parce que la protéine Rhbg exerce un rôle différent de celui de transporteur de NH_3 .

6.1 – Récepteur à l'ammonium

Les glycoprotéines Rh pourraient aussi jouer le rôle de récepteurs à l'ammonium. En effet, il a été suggéré que l'ammonium pourrait stimuler la réabsorption de HCO_3^- au niveau des canaux collecteurs par l'activation de la H^+/K^+ ATPase apicale (Frank *et al.*, 2000; Frank and Weiner, 2001). De plus, l'activité des échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de la famille des AE est stimulée par le NH_4Cl extracellulaire lorsqu'ils sont exprimés dans des ovocytes de Xénope

(Humphreys *et al.*, 1997; Chernova *et al.*, 2003), mais également dans l'épithélium (Frank and Weiner, 2001). Ainsi une coopération fonctionnelle entre les protéines RhBG et l'AE1 pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation de l'activité $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ par l'ammonium extracellulaire. Une collaboration avec le Dr A. Tøye (Université de Bristol, Royaume-Uni) va par ailleurs débiter pour déterminer si la présence de RhBG à la membrane basolatérale de cellules épithéliales rénales pourrait réguler l'activité de kAE1 et inversement (figure 47).

6.2 – Implication dans diverses pathologies rénales

Le gène codant la protéine RhBG humaine est localisé dans la même région chromosomique que le gène candidat de la maladie kystique de la médullaire rénale de l'adulte (Christodoulou *et al.*, 1998). Il se pourrait que RhBG soit responsable de cette pathologie mais l'analyse des mutations de patients n'a pas confirmé cette hypothèse (Wolf *et al.*, 2003). Certaines acidoses tubulaires distales inexplicables pourraient être liées aux protéines RhBG et RhCG. Il serait intéressant de rechercher chez ces patients, des mutations ou polymorphismes de ces protéines.

7 – Recherche de partenaires cytoplasmiques

Une recherche de partenaires cytoplasmiques de RhBG sera entreprise en utilisant la technologie du TAP-tag (Tandem Affinity Purification), qui combine la double purification d'affinité de complexe(s) protéique(s) contenant l'extrémité C-terminale de RhBG à l'identification par spectrométrie de masse du composant inconnu de ce(s) complexe(s). Nous espérons ainsi prouver définitivement la liaison de RhBG à l'ankyrine G, confirmer la nature de la kinase impliquée dans sa phosphorylation et découvrir de nouveaux partenaires jouant un rôle dans l'adressage, l'ancrage ou la fonction de RhBG.

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés durant ma thèse permettent de démontrer le rôle régulateur essentiel de l'extrémité C-terminale de RhBG sur la fonction biologique et l'adressage membranaire de la protéine. La tyrosine Y429 y joue probablement

un rôle central. Sa phosphorylation permet l'adressage basolatéral de RhBG dans des cellules épithéliales rénales polarisées et sa déphosphorylation pourrait induire un changement conformationnel de l'extrémité C-terminale qui augmenterait l'affinité de la liaison de RhBG au squelette membranaire, via l'ankyrine G, et par conséquent, activerait sa fonction de transport de NH_3 .

BIBLIOGRAPHIE

A

Andrade, S.L., Dickmanns, A., Ficner, R., and Einsle, O. (2005). Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14994-14999.

Arce, M.A., Thompson, E.S., Wagner, S., Coyne, K.E., Ferdman, B.A., and Lublin, D.M. (1993). Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 82, 651-655.

Arcondeguy, T., Jack, R., and Merrick, M. (2001). P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 80-105.

Atkinson, M.R., Blauwkamp, T.A., Bondarenko, V., Studitsky, V., and Ninfa, A.J. (2002). Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation. *J Bacteriol* 184, 5358-5363.

Atkinson, M.R., and Ninfa, A.J. (1999). Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32, 301-313.

Avent, N.D., Butcher, S.K., Liu, W., Mawby, W.J., Mallinson, G., Parsons, S.F., Anstee, D.J., and Tanner, M.J. (1992). Localization of the C termini of the Rh (rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 267, 15134-15139.

Avent, N.D., Finning, K.M., Liu, W., and Scott, M.L. (1996). Molecular biology of partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol* 3, 511-516.

Avent, N.D., and Reid, M.E. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood* 95, 375-387.

B

Bailly, P., Hermand, P., Callebaut, I., Sonneborn, H.H., Khamlichi, S., Mornon, J.P., and Cartron, J.P. (1994). The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5306-5310.

Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J.P., and Gahmberg, C.G. (1995). The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* 25, 3316-3320.

Bakouh, N., Benjelloun, F., Hulin, P., Brouillard, F., Edelman, A., Cherif-Zahar, B., and Planelles, G. (2004). NH₃ is involved in the NH₄⁺ transport induced by the functional expression of the human Rh C glycoprotein. *J Biol Chem* 279, 15975-15983.

- Bastani, B. (1995). Colocalization of H-ATPase and H,K-ATPase immunoreactivity in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 5, 1476-1482.
- Benjelloun, F., Bakouh, N., Fritsch, J., Hulin, P., Lipecka, J., Edelman, A., Planelles, G., Thomas, S.R., and Cherif-Zahar, B. (2005). Expression of the human erythroid Rh glycoprotein (RhAG) enhances both NH₃ and NH₄⁺ transport in HeLa cells. *Pflugers Arch* 450, 155-167.
- Bennett, V. (1989). The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 988, 107-121.
- Bennett, V., and Baines, A.J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81, 1353-1392.
- Bennett, V., and Healy, J. (2008). Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol Med* 14, 28-36.
- Bhattacharyya, R., Das, A.K., Moitra, P.K., Pal, B., Mandal, I., and Basu, J. (1999). Mapping of a palmitoylatable band 3-binding domain of human erythrocyte membrane protein 4.2. *Biochem J* 340 (Pt 2), 505-512.
- Bierman, A.J., Tertoolen, L.G., de Laat, S.W., and Moolenaar, W.H. (1987). The Na⁺/H⁺ exchanger is constitutively activated in P19 embryonal carcinoma cells, but not in a differentiated derivative. Responsiveness to growth factors and other stimuli. *J Biol Chem* 262, 9621-9628.
- Binstock, L., and Lecar, H. (1969). Ammonium ion currents in the squid giant axon. *J Gen Physiol* 53, 342-361.
- Biswas, K., and Morschhauser, J. (2005). The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 56, 649-669.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.
- Boeckstaens, M., Andre, B., and Marini, A.M. (2007). The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol Microbiol* 64, 534-546.
- Bonifacino, J.S., and Dell'Angelica, E.C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 145, 923-926.
- Broach, J., Neumann, C., and Kustu, S. (1976). Mutant strains (nit) of *Salmonella typhimurium* with a pleiotropic defect in nitrogen metabolism. *J Bacteriol* 128, 86-98.
- Brown, E.J., and Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11, 130-135.
- Bruce, L.J., Beckmann, R., Ribeiro, M.L., Peters, L.L., Chasis, J.A., Delaunay, J., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Tanner, M.J. (2003). A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 101, 4180-4188.

C

- Callebaut, I., Dulin, F., Bertrand, O., Ripoche, P., Mouro, I., Colin, Y., Mornon, J.P., and Cartron, J.P. (2006). Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfus Clin Biol* 13, 70-84.
- Canfield, W.M., Johnson, K.F., Ye, R.D., Gregory, W., and Kornfeld, S. (1991). Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 266, 5682-5688.
- Carlson, E.A. (1958). The bearing of a complex-locus in *Drosophila* on the interpretation of the Rh series. *Am J Hum Genet* 10, 465-473.
- Cartron, J.P. (1999). RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12, 655-689.
- Cartron, J.P., and Colin, Y. (2001). Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 8, 163-199.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, N., Whittaker, M., and Arp, D. (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 185, 2759-2773.
- Chambrey, R., Goossens, D., Bourgeois, S., Picard, N., Bloch-Faure, M., Leviel, F., Geoffroy, V., Cambillau, M., Colin, Y., Paillard, M., Houillier, P., Cartron, J.P., and Eladari, D. (2005). Genetic ablation of Rhbg in the mouse does not impair renal ammonium excretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F1281-1290.
- Cherif-Zahar, B., Bloy, C., Le Van Kim, C., Blanchard, D., Bailly, P., Hermand, P., Salmon, C., Cartron, J.P., and Colin, Y. (1990). Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6243-6247.
- Cherif-Zahar, B., Durand, A., Schmidt, I., Hamdaoui, N., Matic, I., Merrick, M., and Matassi, G. (2007). Evolution and functional characterization of the RH50 gene from the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 189, 9090-9100.
- Cherif-Zahar, B., Le Van Kim, C., Rouillac, C., Raynal, V., Cartron, J.P., and Colin, Y. (1994). Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics* 19, 68-74.
- Cherif-Zahar, B., Mattei, M.G., Le Van Kim, C., Bailly, P., Cartron, J.P., and Colin, Y. (1991). Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet* 86, 398-400.
- Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Gane, P., Mattei, M.G., Bailly, P., Gibbs, B., Colin, Y., and Cartron, J.P. (1996). Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet* 12, 168-173.

Chernova, M.N., Stewart, A.K., Jiang, L., Friedman, D.J., Kunes, Y.Z., and Alper, S.L. (2003). Structure-function relationships of AE2 regulation by Ca^{2+} -sensitive stimulators NH_4^+ and hypertonicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1235-1246.

Christodoulou, K., Tsingis, M., Stavrou, C., Eleftheriou, A., Papapavlou, P., Patsalis, P.C., Ioannou, P., Pierides, A., and Constantinou Deltas, C. (1998). Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 7, 905-911.

Chung, H.J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2006). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8870-8875.

Colin, Y., Cherif-Zahar, B., Le Van Kim, C., Raynal, V., Van Huffel, V., and Cartron, J.P. (1991). Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 78, 2747-2752.

Conroy, M.J., Bullough, P.A., Merrick, M., and Avent, N.D. (2005). Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol* 131, 543-551.

Conroy, M.J., Durand, A., Lupo, D., Li, X.D., Bullough, P.A., Winkler, F.K., and Merrick, M. (2007). The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1213-1218.

Coombs, R.R.A., Mourant, A.E., and Race, R.R. (1945). Detection of weak and incomplete Rh agglutinins : a new test. *Lancet* 2, 15.

Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., and Merrick, M. (2002). Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *Embo J* 21, 536-545.

D

Dahl, K.N., Parthasarathy, R., Westhoff, C.M., Layton, D.M., and Discher, D.E. (2004). Protein 4.2 is critical to CD47-membrane skeleton attachment in human red cells. *Blood* 103, 1131-1136.

Dahl, K.N., Westhoff, C.M., and Discher, D.E. (2003). Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood* 101, 1194-1199.

Dahr, W., Kordowicz, M., Moulds, J., Gielen, W., Lebeck, L., and Kruger, J. (1987). Characterization of the Ss sialoglycoprotein and its antigens in Rhnull erythrocytes. *Blut* 54, 13-24.

Daniels, G.L., Cartron, J.P., Fletcher, A., Garratty, G., Henry, S., Jorgensen, J., Judd, W.J., Levene, C., Lin, M., Lomas-Francis, C., Moulds, J.J., Moulds, J.M., Moulds, M., Overbeeke, M., Reid, M.E., Rouger, P., Scott, M., Sistonen, P., Smart, E., Tani, Y., Wendel, S., and Zelinski, T. (2003). International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red cell surface antigens: Vancouver Report. *Vox Sang* 84, 244-247.

Davis, J.Q., Lambert, S., and Bennett, V. (1996). Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135, 1355-1367.

Davis, L.H., and Bennett, V. (1990). Mapping the binding sites of human erythrocyte ankyrin for the anion exchanger and spectrin. *J Biol Chem* 265, 10589-10596.

Delaunay, J. (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev* 21, 1-20.

Devarajan, P., Stabach, P.R., De Matteis, M.A., and Morrow, J.S. (1997). Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10711-10716.

Dubois, E., and Grenson, M. (1979). Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Mol Gen Genet* 175, 67-76.

E

El Nemer, W. (2000). Bases Moléculaires et Relations Structure/Fonction des antigènes de Groupe Sanguin Luthéran : Fonction d'Adhérence à la Laminine et Polarisation Membranaire Epithéliale. Thèse d'Université Paris Diderot - Paris 7.

Eladari, D., Cheval, L., Quentin, F., Bertrand, O., Mouro, I., Cherif-Zahar, B., Cartron, J.P., Paillard, M., Doucet, A., and Chambrey, R. (2002). Expression of RhCG, a new putative NH(3)/NH(4)(+) transporter, along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* 13, 1999-2008.

Emmons, C., and Kurtz, I. (1994). Functional characterization of three intercalated cell subtypes in the rabbit outer cortical collecting duct. *J Clin Invest* 93, 417-423.

Endeward, V., Cartron, J.P., Ripoché, P., and Gros, G. (2008). RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *FASEB J* 22, 64-73.

Eyers, S.A., Ridgwell, K., Mawby, W.J., and Tanner, M.J. (1994). Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides. *J Biol Chem* 269, 6417-6423.

F

Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W., and Roach, P.J. (1987). Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* 262, 14042-14048.

Flessner, M.F., Wall, S.M., and Knepper, M.A. (1991). Permeabilities of rat collecting duct segments to NH₃ and NH₄⁺. *Am J Physiol* 260, F264-272.

Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J.S., and Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-198.

Frank, A.E., and Weiner, I.D. (2001). Effects of ammonia on acid-base transport by the B-type intercalated cell. *J Am Soc Nephrol* 12, 1607-1614.

Frank, A.E., Wingo, C.S., and Weiner, I.D. (2000). Effects of ammonia on bicarbonate transport in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F219-226.

Fransen, E., Lemmon, V., Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P., and Willems, P.J. (1995). CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3, 273-284.

Friedlander, G. (2005). [Dark cells: the endless story]. *Med Sci (Paris)* 21, 655-657.

G

Gahmberg, C.G. (1983). Molecular characterization of the human red cell Rho(D) antigen. *Embo J* 2, 223-227.

Gane, P., Le Van Kim, C., Bony, V., El Nemer, W., Mouro, I., Nicolas, V., Colin, Y., and Cartron, J.P. (2001). Flow cytometric analysis of the association between blood group-related proteins and the detergent-insoluble material of K562 cells and erythroid precursors. *Br J Haematol* 113, 680-688.

Gao, A.G., Lindberg, F.P., Finn, M.B., Blystone, S.D., Brown, E.J., and Frazier, W.A. (1996). Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem* 271, 21-24.

Garver, T.D., Ren, Q., Tuvia, S., and Bennett, V. (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137, 703-714.

Gimm, A., Mouro, I., Lambin, P., Mohandas, N., and Cartron, J.P. (2000). Direct evidence for in situ interaction between Rh complex and membrane skeleton in intact red cells. *Vox Sang* 78(Suppl 1), 14 (abstract).

Ginns, S.M., Knepper, M.A., Ecelbarger, C.A., Terris, J., He, X., Coleman, R.A., and Wade, J.B. (1996). Immunolocalization of the secretory isoform of Na-K-Cl cotransporter in rat renal intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 7, 2533-2542.

Good, D.W. (1988). Active absorption of NH₄⁺ by rat medullary thick ascending limb: inhibition by potassium. *Am J Physiol* 255, F78-87.

Good, D.W., and DuBose, T.D., Jr. (1987). Ammonia transport by early and late proximal convoluted tubule of the rat. *J Clin Invest* 79, 684-691.

Good, D.W., Knepper, M.A., and Burg, M.B. (1984). Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol* 247, F35-44.

H

Hagen, T., and Vidal-Puig, A. (2002). Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 324-328.

Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R.J. (1998). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626-630.

Hall, T.G., and Bennett, V. (1987). Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 262, 10537-10545.

Han, K.H., Croker, B.P., Clapp, W.L., Werner, D., Sahni, M., Kim, J., Kim, H.Y., Handlogten, M.E., and Weiner, I.D. (2006). Expression of the ammonia transporter, rh C glycoprotein, in normal and neoplastic human kidney. *J Am Soc Nephrol* 17, 2670-2679.

Handlogten, M.E., Hong, S.P., Westhoff, C.M., and Weiner, I.D. (2004). Basolateral ammonium transport by the mouse inner medullary collecting duct cell (mIMCD-3). *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F628-638.

Handlogten, M.E., Hong, S.P., Westhoff, C.M., and Weiner, I.D. (2005a). Apical ammonia transport by the mouse inner medullary collecting duct cell (mIMCD-3). *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F347-358.

Handlogten, M.E., Hong, S.P., Zhang, L., Vander, A.W., Steinbaum, M.L., Campbell-Thompson, M., and Weiner, I.D. (2005b). Expression of the ammonia transporter proteins Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein in the intestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1036-1047.

Hartel-Schenk, S., and Agre, P. (1992). Mammalian red cell membrane Rh polypeptides are selectively palmitoylated subunits of a macromolecular complex. *J Biol Chem* 267, 5569-5574.

Hemker, M.B., Cheroutre, G., van Zwieten, R., Maaskant-van Wijk, P.A., Roos, D., Loos, J.A., van der Schoot, C.E., and von dem Borne, A.E. (2003). The Rh complex exports ammonium from human red blood cells. *Br J Haematol* 122, 333-340.

Hernand, P., Huet, M., Callebaut, I., Gane, P., Ihanus, E., Gahmberg, C.G., Cartron, J.P., and Bailly, P. (2000). Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol Chem* 275, 26002-26010.

Hernand, P., Mouro, I., Huet, M., Bloy, C., Suyama, K., Goldstein, J., Cartron, J.P., and Bailly, P. (1993). Immunochemical characterization of rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. *Blood* 82, 669-676.

Hillmann, P., Kose, M., Sohl, K., and Muller, C.E. (2008). Ammonium-induced calcium mobilization in 1321N1 astrocytoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 227, 36-47.

Hisatsune, C., Kuroda, Y., Nakamura, K., Inoue, T., Nakamura, T., Michikawa, T., Mizutani, A., and Mikoshiba, K. (2004). Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 18887-18894.

Holm, L.M., Jahn, T.P., Moller, A.L., Schjoerring, J.K., Ferri, D., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T. (2005). NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 450, 415-428.

Huang, C.H. (1998). The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organization and associated splicing defect resulting in Rh(null) disease. *J Biol Chem* 273, 2207-2213.

Huang, C.H., and Liu, P.Z. (2001). New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells Mol Dis* 27, 90-101.

Huang, C.H., and Peng, J. (2005). Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15512-15517.

Humphreys, B.D., Chernova, M.N., Jiang, L., Zhang, Y., and Alper, S.L. (1997). NH₄Cl activates AE2 anion exchanger in *Xenopus* oocytes at acidic pHi. *Am J Physiol* 272, C1232-1240.

J

Jahn, T.P., Moller, A.L., Zeuthen, T., Holm, L.M., Klaerke, D.A., Mohsin, B., Kuhlbrandt, W., and Schjoerring, J.K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* 574, 31-36.

Javelle, A., Andre, B., Marini, A.M., and Chalot, M. (2003). High-affinity ammonium transporters and nitrogen sensing in mycorrhizas. *Trends Microbiol* 11, 53-55.

Javelle, A., Lupo, D., Li, X.D., Merrick, M., Chami, M., Ripoché, P., and Winkler, F.K. (2007). Structural and mechanistic aspects of Amt/Rh proteins. *J Struct Biol* 158, 472-481.

Javelle, A., Severi, E., Thornton, J., and Merrick, M. (2004). Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J Biol Chem* 279, 8530-8538.

Javelle, A., Thomas, G., Marini, A.M., Kramer, R., and Merrick, M. (2005). In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem J* 390, 215-222.

Jenkins, S.M., and Bennett, V. (2001). Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155, 739-746.

Jiang, P., Peliska, J.A., and Ninfa, A.J. (1998). Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* 37, 12782-12794.

Johansson, F.K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C.F., Uhrbom, L., and Westermark, B. (2004). Identification of candidate cancer-causing genes in mouse brain tumors by retroviral tagging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11334-11337.

K

Kamberov, E.S., Atkinson, M.R., and Ninfa, A.J. (1995). The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J Biol Chem* 270, 17797-17807.

Karim, Z., Szutkowska, M., Vernimmen, C., and Bichara, M. (2005). Renal handling of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$: recent concepts. *Nephron Physiol* 101, p77-81.

Khademi, S., O'Connell, J., 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J., and Stroud, R.M. (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305, 1587-1594.

Kim, H.Y., Baylis, C., Verlander, J.W., Han, K.H., Reungjui, S., Handlogten, M.E., and Weiner, I.D. (2007). Effect of reduced renal mass on renal ammonia transporter family, Rh C glycoprotein and Rh B glycoprotein, expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1238-1247.

King, L.S., Kozono, D., and Agre, P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 687-698.

Kitano, T., Sumiyama, K., Shiroishi, T., and Saitou, N. (1998). Conserved evolution of the Rh50 gene compared to its homologous Rh blood group gene. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 78-85.

Kizhatil, K., and Bennett, V. (2004). Lateral membrane biogenesis in human bronchial epithelial cells requires 190-kDa ankyrin-G. *J Biol Chem* 279, 16706-16714.

Kizhatil, K., Davis, J.Q., Davis, L., Hoffman, J., Hogan, B.L., and Bennett, V. (2007a). Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos. *J Biol Chem* 282, 26552-26561.

Kizhatil, K., Yoon, W., Mohler, P.J., Davis, L.H., Hoffman, J.A., and Bennett, V. (2007b). Ankyrin-G and beta2-spectrin collaborate in biogenesis of lateral membrane of human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 282, 2029-2037.

Knepper, M.A., and Agre, P. (2004). Structural biology. The atomic architecture of a gas channel. *Science* 305, 1573-1574.

Knepper, M.A., Packer, R., and Good, D.W. (1989). Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev* 69, 179-249.

L

Labotka, R.J., Lundberg, P., and Kuchel, P.W. (1995). Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ^{14}N and ^{15}N saturation transfer NMR spectroscopy. *Am J Physiol* 268, C686-699.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Landsteiner, K. (1900). Zur kennthis der antifermentativen, lytischen und agglutiniierenden wirkungen des blutserums und der lympe. *Zbl Bakt* 27, 357-366.

Le Van Kim, C., and Colin, Y. (2004). Les antigènes du groupe sanguin Rh : du diagnostic anténatal de la maladie hémolytique du nouveau-né à la fonction de transport d'ammonium. *Hématologie* 10, 372-383.

Le Van Kim, C., Mouro, I., Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Cherrier, C., Cartron, J.P., and Colin, Y. (1992). Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10925-10929.

Le Van Kim, C.L., Colin, Y., and Cartron, J.P. (2006). Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 20, 93-110.

Leigh, J.A., and Dodsworth, J.A. (2007). Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu Rev Microbiol* 61, 349-377.

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 746-785.

Li, X., Jayachandran, S., Nguyen, H.H., and Chan, M.K. (2007). Structure of the *Nitrosomonas europaea* Rh protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19279-19284.

Lin, D., Kamsteeg, E.J., Zhang, Y., Jin, Y., Sterling, H., Yue, P., Roos, M., Duffield, A., Spencer, J., Caplan, M., and Wang, W.H. (2008). Expression of tetraspan protein CD63 activates protein-tyrosine kinase (PTK) and enhances the PTK-induced inhibition of ROMK channels. *J Biol Chem* 283, 7674-7681.

Liu, J., and Magasanik, B. (1995). Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 926-931.

Liu, W., Avent, N.D., Jones, J.W., Scott, M.L., and Voak, D. (1999). Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythroleukemia cells. *Blood* 94, 3986-3996.

Liu, Z., Chen, Y., Mo, R., Hui, C., Cheng, J.F., Mohandas, N., and Huang, C.H. (2000). Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. *J Biol Chem* 275, 25641-25651.

Liu, Z., Peng, J., Mo, R., Hui, C., and Huang, C.H. (2001). Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *J Biol Chem* 276, 1424-1433.

Lopez, C., Metral, S., Eladari, D., Drevensek, S., Gane, P., Chambrey, R., Bennett, V., Cartron, J.P., Le Van Kim, C., and Colin, Y. (2005). The ammonium transporter RhBG: requirement of a tyrosine-based signal and ankyrin-G for basolateral targeting and membrane anchorage in polarized kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 8221-8228.

Loque, D., Lalonde, S., Looger, L.L., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2007). A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* 446, 195-198.

Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1998). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17, 1236-1247.

Lowe, J.S., Palygin, O., Bhasin, N., Hund, T.J., Boyden, P.A., Shibata, E., Anderson, M.E., and Mohler, P.J. (2008). Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol* 180, 173-186.

Ludewig, U. (2004). Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein. *J Physiol* 559, 751-759.

Ludewig, U. (2006). Ion transport versus gas conduction: function of AMT/Rh-type proteins. *Transfus Clin Biol* 13, 111-116.

Ludewig, U., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2002). Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* 277, 13548-13555.

Ludewig, U., von Wiren, N., Rentsch, D., and Frommer, W.B. (2001). Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? *Genome Biol* 2, REVIEWS1010.

Ludewig, U., Wilken, S., Wu, B., Jost, W., Obrdlik, P., El Bakkoury, M., Marini, A.M., Andre, B., Hamacher, T., Boles, E., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2003). Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH_4 uniporters. *J Biol Chem* 278, 45603-45610.

Lupo, D., Li, X.D., Durand, A., Tomizaki, T., Cherif-Zahar, B., Matassi, G., Merrick, M., and Winkler, F.K. (2007). The 1.3-A resolution structure of *Nitrosomonas europaea* Rh50 and mechanistic implications for NH_3 transport by Rhesus family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19303-19308.

M

Madhani, H.D., and Fink, G.R. (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* 8, 348-353.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1-18.

Mak, D.O., Dang, B., Weiner, I.D., Foskett, J.K., and Westhoff, C.M. (2006). Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins RhBG and RhCG. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F297-305.

Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2002). Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem* 277, 26681-26688.

Malhotra, J.D., Thyagarajan, V., Chen, C., and Isom, L.L. (2004). Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279, 40748-40754.

Marcaggi, P., and Coles, J.A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol* 64, 157-183.

- Marini, A.M., and Andre, B. (2000). In vivo N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol Microbiol* 38, 552-564.
- Marini, A.M., Matassi, G., Raynal, V., Andre, B., Cartron, J.P., and Cherif-Zahar, B. (2000a). The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet* 26, 341-344.
- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., and Andre, B. (1997a). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 4282-4293.
- Marini, A.M., Springael, J.Y., Frommer, W.B., and Andre, B. (2000b). Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol Microbiol* 35, 378-385.
- Marini, A.M., Urrestarazu, A., Beauwens, R., and Andre, B. (1997b). The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH₄⁺ transporters. *Trends Biochem Sci* 22, 460-461.
- Marini, A.M., Vissers, S., Urrestarazu, A., and Andre, B. (1994). Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 13, 3456-3463.
- Matassi, G., Cherif-Zahar, B., Pesole, G., Raynal, V., and Cartron, J.P. (1999). The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol* 48, 151-159.
- Mayer, M., Dynowski, M., and Ludewig, U. (2006a). Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1. *Biochem J* 396, 431-437.
- Mayer, M., and Ludewig, U. (2006). Role of AMT1;1 in NH₄⁺ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* 8, 522-528.
- Mayer, M., Schaaf, G., Mouro, I., Lopez, C., Colin, Y., Neumann, P., Cartron, J.P., and Ludewig, U. (2006b). Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transporters. *J Gen Physiol* 127, 133-144.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625.
- Mohler, P.J., Davis, J.Q., and Bennett, V. (2005). Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol* 3, e423.
- Mohler, P.J., Gramolini, A.O., and Bennett, V. (2002). Ankyrins. *J Cell Sci* 115, 1565-1566.
- Mohler, P.J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S.G., and Bennett, V. (2004a). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17533-17538.
- Mohler, P.J., Schott, J.J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M.E., Rogers, T.B., Lederer, W.J., Escande, D., Le Marec, H., and Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421, 634-639.

Mohler, P.J., Splawski, I., Napolitano, C., Bottelli, G., Sharpe, L., Timothy, K., Priori, S.G., Keating, M.T., and Bennett, V. (2004b). A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9137-9142.

Monahan, B.J., Fraser, J.A., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2002a). Isolation and characterization of two ammonium permease genes, *meaA* and *mepA*, from *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 1, 85-94.

Monahan, B.J., Unkles, S.E., Tsing, I.T., Kinghorn, J.R., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2002b). Mutation and functional analysis of the *Aspergillus nidulans* ammonium permease *MeaA* and evidence for interaction with itself and *MepA*. *Fungal Genet Biol* 36, 35-46.

Moore, S., and Green, C. (1987). The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Biochem J* 244, 735-741.

Morett, E., and Segovia, L. (1993). The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* 175, 6067-6074.

Mouro-Chanteloup, I., D'Ambrosio, A.M., Gane, P., Le Van Kim, C., Raynal, V., Dhermy, D., Cartron, J.P., and Colin, Y. (2002). Cell-surface expression of RhD blood group polypeptide is posttranscriptionally regulated by the RhAG glycoprotein. *Blood* 100, 1038-1047.

Mouro, I., Colin, Y., Cherif-Zahar, B., Cartron, J.P., and Le Van Kim, C. (1993). Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet* 5, 62-65.

N

Nagaraj, K., and Hortsch, M. (2006). Phosphorylation of L1-type cell-adhesion molecules--ankyrins away! *Trends Biochem Sci* 31, 544-546.

Nakada, T., Westhoff, C.M., Kato, A., and Hirose, S. (2007). Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins. *Faseb J* 21, 1067-1074.

Nakhoul, N.L., Dejong, H., Abdunour-Nakhoul, S.M., Boulpaep, E.L., Hering-Smith, K., and Hamm, L.L. (2005). Characteristics of renal Rhbg as an NH₄(+) transporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F170-181.

Nawata, C.M., Hung, C.C., Tsui, T.K., Wilson, J.M., Wright, P.A., and Wood, C.M. (2007). Ammonia excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for Rh glycoprotein and H⁺-ATPase involvement. *Physiol Genomics* 31, 463-474.

Neuhauser, B., Dynowski, M., Mayer, M., and Ludewig, U. (2007). Regulation of NH₄⁺ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol* 143, 1651-1659.

Nicolas, V. (2004). Interaction du Complexe Membranaire Rh avec le Squelette Erythrocytaire Spectrine-Dépendant : Caractérisation Moléculaire et Altération dans des Phénotypes Variants. Thèse d'Université Paris Diderot - Paris 7.

Nicolas, V., Le Van Kim, C., Gane, P., Birkenmeier, C., Cartron, J.P., Colin, Y., and Mouro-Chanteloup, I. (2003). Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem* 278, 25526-25533.

Nicolas, V., Mouro-Chanteloup, I., Lopez, C., Gane, P., Gimm, A., Mohandas, N., Cartron, J.P., Le Van Kim, C., and Colin, Y. (2006). Functional interaction between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells. *Transfus Clin Biol* 13, 23-28.

Ninfa, A.J., and Jiang, P. (2005). PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* 8, 168-173.

Ninfa, A.J., and Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5909-5913.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J., and Mohandas, N. (2000). Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 275, 24540-24546.

O

Odell, A.F., Scott, J.L., and Van Helden, D.F. (2005). Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* 280, 37974-37987.

Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051-2054.

P

Palek, J., and Lambert, S. (1990). Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 27, 290-332.

Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., and Cooper, E.C. (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26, 2599-2613.

Pawson, T., Gish, G.D., and Nash, P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* 11, 504-511.

Peters, L.L., John, K.M., Lu, F.M., Eicher, E.M., Higgins, A., Yialamas, M., Turtzo, L.C., Otsuka, A.J., and Lux, S.E. (1995). Ank3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain. *J Cell Biol* 130, 313-330.

Piepenhagen, P.A., Peters, L.L., Lux, S.E., and Nelson, W.J. (1995). Differential expression of Na(+)-K(+)-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. *Am J Physiol* 269, C1417-1432.

Planelles, G. (2007). Ammonium homeostasis and human Rhesus glycoproteins. *Nephron Physiol* 105, p11-17.

Poole, J., and Daniels, G. (2007). Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 21, 58-71.

Q

Quentin, F. (2005). Caractérisation et Régulation de Protéines de Transport Membranaire du Néphron Distal Impliquées dans la Régulation de l'état Acide-Base et du Bilan du Chlorure de Sodium par le Rein. Thèse d'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6.

Quentin, F., Eladari, D., Cheval, L., Lopez, C., Goossens, D., Colin, Y., Cartron, J.P., Paillard, M., and Chambrey, R. (2003). RhBG and RhCG, the putative ammonia transporters, are expressed in the same cells in the distal nephron. *J Am Soc Nephrol* 14, 545-554.

R

Raghuram, V., Mak, D.O., and Foskett, J.K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1300-1305.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11), 3419-3425.

Ridgwell, K., Evers, S.A., Mawby, W.J., Anstee, D.J., and Tanner, M.J. (1994). Studies on the glycoprotein associated with Rh (rhesus) blood group antigen expression in the human red blood cell membrane. *J Biol Chem* 269, 6410-6416.

Ridgwell, K., Spurr, N.K., Laguda, B., MacGeoch, C., Avent, N.D., and Tanner, M.J. (1992). Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem J* 287 (Pt 1), 223-228.

Ridgwell, K., Tanner, M.J., and Anstee, D.J. (1984). The Rhesus (D) polypeptide is linked to the human erythrocyte cytoskeleton. *FEBS Lett* 174, 7-10.

Ripoche, P., Bertrand, O., Gane, P., Birkenmeier, C., Colin, Y., and Cartron, J.P. (2004). Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH(3) into red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17222-17227.

Rouillac, C., Colin, Y., Hughes-Jones, N.C., Beolet, M., D'Ambrosio, A.M., Cartron, J.P., and Le Van Kim, C. (1995). Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood* 85, 2937-2944.

S

- Salvignol, I., Calvas, P., Socha, W.W., Colin, Y., Le Van Kim, C., Bailly, P., Ruffie, J., Cartron, J.P., and Blancher, A. (1995). Structural analysis of the RH-like blood group gene products in nonhuman primates. *Immunogenetics* 41, 271-281.
- Saparov, S.M., Liu, K., Agre, P., and Pohl, P. (2007). Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J Biol Chem* 282, 5296-5301.
- Scotland, P., Zhou, D., Benveniste, H., and Bennett, V. (1998). Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol* 143, 1305-1315.
- Seack, J., Pancer, Z., Muller, I.M., and Muller, W.E. (1997). Molecular cloning and primary structure of a Rhesus (Rh)-like protein from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 46, 493-498.
- Senes, A., Engel, D.E., and DeGrado, W.F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14, 465-479.
- Seshadri, R.M., Klein, J.D., Kozlowski, S., Sands, J.M., Kim, Y.H., Han, K.H., Handlogten, M.E., Verlander, J.W., and Weiner, I.D. (2006). Renal expression of the ammonia transporters, Rhbg and Rhcg, in response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F397-408.
- Shawcross, D., and Jalan, R. (2005). The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 62, 2295-2304.
- Shechter, E. (1997). *Biochimie et Biophysique des membranes* Masson, 1-466.
- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24, 1-29.
- Shirahata, E., Iwasaki, H., Takagi, M., Lin, C., Bennett, V., Okamura, Y., and Hayasaka, K. (2006). Ankyrin-G regulates inactivation gating of the neuronal sodium channel, Nav1.6. *J Neurophysiol* 96, 1347-1357.
- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R., and Hunziker, W. (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* 4, 154-159.
- Singleton, B.K., Green, C.A., Avent, N.D., Martin, P.G., Smart, E., Daka, A., Narter-Olaga, E.G., Hawthorne, L.M., and Daniels, G. (2000). The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95, 12-18.
- Smith, B.L., Baumgarten, R., Nielsen, S., Raben, D., Zeidel, M.L., and Agre, P. (1993). Concurrent expression of erythroid and renal aquaporin CHIP and appearance of water channel activity in perinatal rats. *J Clin Invest* 92, 2035-2041.

Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., and Perlin, M.H. (2003). Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Mol Microbiol* 50, 259-275.

Smythe, J.S., Avent, N.D., Judson, P.A., Parsons, S.F., Martin, P.G., and Anstee, D.J. (1996). Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood* 87, 2968-2973.

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., and Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.

Soupene, E., He, L., Yan, D., and Kustu, S. (1998). Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7030-7034.

Soupene, E., Inwood, W., and Kustu, S. (2004). Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7787-7792.

Soupene, E., King, N., Feild, E., Liu, P., Niyogi, K.K., Huang, C.H., and Kustu, S. (2002a). Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7769-7773.

Soupene, E., Lee, H., and Kustu, S. (2002b). Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffusion of NH₃ bidirectionally. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3926-3931.

Soupene, E., Ramirez, R.M., and Kustu, S. (2001). Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH(3) across the cytoplasmic membrane. *Mol Cell Biol* 21, 5733-5741.

Stephens, D.J., and Banting, G. (1997). Insulin dependent tyrosine phosphorylation of the tyrosine internalisation motif of TGN38 creates a specific SH2 domain binding site. *FEBS Lett* 416, 27-29.

Stone, D.K., Seldin, D.W., Kokko, J.P., and Jacobson, H.R. (1983). Anion dependence of rabbit medullary collecting duct acidification. *J Clin Invest* 71, 1505-1508.

Suto, Y., Ishikawa, Y., Hyodo, H., Uchikawa, M., and Juji, T. (2000). Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum Genet* 106, 164-171.

Szerb, J.C., and Butterworth, R.F. (1992). Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 39, 135-153.

T

Tanner, M.J. (1997). The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review). *Mol Membr Biol* 14, 155-165.

Teichert, S., Rutherford, J.C., Wottawa, M., Heitman, J., and Tudzynski, B. (2008). Impact of ammonium permeases mepA, mepB, and mepC on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 7, 187-201.

Teng-umnuay, P., Verlander, J.W., Yuan, W., Tisher, C.C., and Madsen, K.M. (1996). Identification of distinct subpopulations of intercalated cells in the mouse collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 7, 260-274.

Thomas, G., Coutts, G., and Merrick, M. (2000a). The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet* 16, 11-14.

Thomas, G.H., Mullins, J.G., and Merrick, M. (2000b). Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol* 37, 331-344.

Tippett, P. (1978). Depressed Rh phenotypes. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 21, 135-150.

Toye, A.M. (2005). Defective kidney anion-exchanger 1 (AE1, Band 3) trafficking in dominant distal renal tubular acidosis (dRTA). *Biochem Soc Symp*, 47-63.

Toye, A.M., Banting, G., and Tanner, M.J. (2004). Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *J Cell Sci* 117, 1399-1410.

Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M., and Bennett, V. (1999). Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *J Cell Biol* 147, 995-1008.

Tuvia, S., Garver, T.D., and Bennett, V. (1997). The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12957-12962.

V

Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenco, A., Quintino, E., Versele, M., and Thevelein, J.M. (2006). Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol Microbiol* 59, 1485-1505.

Vela, J., Perez-Millan, M.I., Becu-Villalobos, D., and Diaz-Torga, G. (2007). Different kinases regulate activation of voltage-dependent calcium channels by depolarization in GH3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C951-959.

Verlander, J.W., Miller, R.T., Frank, A.E., Royaux, I.E., Kim, Y.H., and Weiner, I.D. (2003). Localization of the ammonium transporter proteins RhBG and RhCG in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F323-337.

W

Wagner, F.F., and Flegel, W.A. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95, 3662-3668.

Wagner, F.F., Frohmayer, A., and Flegel, W.A. (2001). RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2, 10.

Wagner, F.F., Gassner, C., Muller, T.H., Schonitzer, D., Schunter, F., and Flegel, W.A. (1999). Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 93, 385-393.

- Waisbren, S.J., Geibel, J., Boron, W.F., and Modlin, I.M. (1994a). Luminal perfusion of isolated gastric glands. *Am J Physiol* 266, C1013-1027.
- Waisbren, S.J., Geibel, J.P., Modlin, I.M., and Boron, W.F. (1994b). Unusual permeability properties of gastric gland cells. *Nature* 368, 332-335.
- Wall, S.M. (1997). Ouabain reduces net acid secretion and increases pHi by inhibiting NH₄⁺ uptake on rat tMCD Na(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol* 273, F857-868.
- Wang, S., Yue, H., Derin, R.B., Guggino, W.B., and Li, M. (2000). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103, 169-179.
- Weidinger, K., Neuhauser, B., Gilch, S., Ludewig, U., Meyer, O., and Schmidt, I. (2007). Functional and physiological evidence for a rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* 273, 260-267.
- Weiner, I.D., Miller, R.T., and Verlander, J.W. (2003). Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the mouse liver. *Gastroenterology* 124, 1432-1440.
- Weiss, V., and Magasanik, B. (1988). Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8919-8923.
- Westhoff, C.M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.O., and Foskett, J.K. (2002). Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J Biol Chem* 277, 12499-12502.
- Westhoff, C.M., Siegel, D.L., Burd, C.G., and Foskett, J.K. (2004). Mechanism of genetic complementation of ammonium transport in yeast by human erythrocyte Rh-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 279, 17443-17448.
- Westhoff, C.M., and Wylie, D.E. (1996). Investigation of the RH locus in gorillas and chimpanzees. *J Mol Evol* 42, 658-668.
- Whittard, J.D., Sakurai, T., Cassella, M.R., Gazdoui, M., and Felsenfeld, D.P. (2006). MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth. *Mol Biol Cell* 17, 2696-2706.
- Wiame, J.M., Grenson, M., and Arst, H.N., Jr. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* 26, 1-88.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., and et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38.
- Wolf, M.T., Karle, S.M., Schwarz, S., Anlauf, M., Anlauf, M., Glaeser, L., Kroiss, S., Burton, C., Feest, T., Otto, E., Fuchshuber, A., and Hildebrandt, F. (2003). Refinement of the critical region for MCKD1 by detection of transcontinental haplotype sharing. *Kidney Int* 64, 788-792.
- Wood, C.C., Poree, F., Dreyer, I., Koehler, G.J., and Udvardi, M.K. (2006). Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing *Arabidopsis AtAMT1;1*. *FEBS Lett* 580, 3931-3936.

Wu, H., Windmiller, D.A., Wang, L., and Backer, J.M. (2003). YXXM motifs in the PDGF-beta receptor serve dual roles as phosphoinositide 3-kinase binding motifs and tyrosine-based endocytic sorting signals. *J Biol Chem* 278, 40425-40428.

X

Xia, Z., Gray, J.A., Compton-Toth, B.A., and Roth, B.L. (2003). A direct interaction of PSD-95 with 5-HT2A serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* 278, 21901-21908.

Y

Yang, B., Zhao, D., Solenov, E., and Verkman, A.S. (2006). Evidence from knockout mice against physiologically significant aquaporin 8-facilitated ammonia transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C417-423.

Z

Zheng, L., Kostrewa, D., Berneche, S., Winkler, F.K., and Li, X.D. (2004). The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17090-17095.

Zhou, D., Lambert, S., Malen, P.L., Carpenter, S., Boland, L.M., and Bennett, V. (1998). AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143, 1295-1304.

Zidi-Yahiaoui, N., Mouro-Chanteloup, I., D'Ambrosio, A.M., Lopez, C., Gane, P., Le van Kim, C., Cartron, J.P., Colin, Y., and Ripoche, P. (2005). Human Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated ammonium transport in recombinant kidney cells. *Biochem J* 391, 33-40.

ANNEXE